

Tetraetherlipidderivate und Tetraetherlipidderivate enthaltende Liposomen und Lipidagglomerate sowie deren Verwendung

Patent number: DE10065561
Publication date: 2002-07-11
Inventor: KUEHL CHRISTINE (DE); TEWES BERNHARD (DE);
HAGEN MARTIN (DE); GROPP FELIX (DE); LITTGER
RALF (DE); MARX UWE (DE)
Applicant: BERNINA BIOSYSTEMS GMBH (DE)
Classification:
- international: (IPC1-7): C07F9/09
- european: A61K9/127B2; C07D323/00; C07F9/10
Application number: DE20001065561 20001228
Priority number(s): DE20001065561 20001228

Also published as:

WO02053554 (A:
WO02053554 (A:
EP1347964 (A3)
EP1347964 (A2)

Report a data error he

Abstract of DE10065561

The invention relates to novel tetraether lipid derivatives which can be used for producing liposomes and lipid agglomerates with improved stability which are simple and reliable. The invention also relates to liposomes and lipid agglomerates with an increased lifespan in vivo.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 65 561 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:
C 07 F 9/09

②① Aktenzeichen: 100 65 561.0
②② Anmeldetag: 28. 12. 2000
④③ Offenlegungstag: 11. 7. 2002

DE 100 65 561 A 1

⑦① Anmelder:
Bernina Biosystems GmbH, 82152 Planegg, DE

⑦④ Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,
80538 München

⑦② Erfinder:
Kühl, Christine, Dr., 82152 Planegg, DE; Tewes,
Bernhard, Dr., 81371 München, DE; Hagen, Martin,
Dr., 80687 München, DE; Gropp, Felix, Dr., 81375
München, DE; Littger, Ralf, Dr., 81667 München, DE;
Marx, Uwe, Dr., 81369 München, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ Tetraetherlipidderivate und Tetraetherlipidderivate enthaltende Liposomen und Lipidagglomerate sowie deren Verwendung
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft neue Tetraetherlipidderivate, die zur Herstellung von einfach und verlässlich anwendbaren Liposomen und Lipidagglomeraten mit verbesserter Stabilität verwendet werden können. Die Erfindung betrifft ebenfalls Liposomen und Lipidagglomerate mit einer höheren Lebensdauer in vivo.

DE 100 65 561 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Tetraetherlipidderivate, die erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate enthaltende Liposomen und Lipidagglomerate und deren Verwendung.

5 **[0002]** In der wissenschaftlichen Forschung besteht ein großer Bedarf an Verfahren zur Transfektion von Zellen in Zellkultur und von multizellulären Organismen mit Nukleinsäuren. Die herkömmlichen Verfahren wie Elektroporation, DEAE- und "Calciumphosphat"-unterstützte Transfektion, Mikroinjektion oder ballistische Methoden haben den Nach-
 10 teil, daß sie oft nur geringe Transfektionseffizienzen erreichen, die Zellüberlebensraten sehr gering sind und/oder, daß sie nicht an Mehrzellern durchführbar sind. Virale und retrovirale Transfektionssysteme sind zwar effizienter, bergen aber eigene Risiken, wie z. B. eine erhöhte Immunantwort oder eine unkontrollierte Integration in das Zielgenom. Die Trans-
 fektion von nicht-viralen Nukleinsäuren mit Hilfe von Liposomen, auch Lipofektion genannt, stellt daher eine erfolgrei-
 che und bereits häufig angewandte Alternative zu den oben beschriebenen Verfahren dar.

[0003] Liposomen sind künstlich hergestellte uni- oder multilamellare Lipidvesikel, die einen wäßrigen Innenraum umschließen. Eventuell im wäßrigen Innenraum des Liposoms enthaltene Verbindungen sind weitgehend gegen proteo-
 15 lytische oder nukleolytische Angriffe geschützt. Die Lipidvesikel sind im allgemeinen biologischen Membranen ähnlich und werden daher nach Anlagerung an dieselben oftmals leicht in die Membranstruktur integriert. Bei dieser Membran-
 fusion wird der Inhalt des Liposomeninnenraums in das von der biologischen Membran umschlossene Lumen entladen. Alternativ werden die Liposomen nach endocytotischer Aufnahme in den Lysosomen der Zellen abgebaut. Der dort frei-
 gesetzte Inhalt des Liposomeninnenraumes kann dann von dort in das Cytosol der Zelle übertreten.

20 **[0004]** Liposomen können daher als Transportvehikel benutzt werden. Neben der bereits erwähnten Verwendung als Lipofektionsmittel, d. h. als Transportvehikel für Nukleinsäuren, werden Liposomen vielfach als Transportvehikel für
 Therapeutika eingesetzt. Für diese unter dem Stichwort "drug delivery" bekannt gewordene Funktion werden hydrophile
 Therapeutika, z. B. "small molecules", Peptide oder Proteine im wässrigen Innenraum des Liposoms verpackt und/oder
 25 hydrophobe Verbindungen in die hydrophobe Matrix, d. h. die Lipidschicht der Liposomen eingebaut. So stellt z. B. die
 Kosmetikindustrie Liposomen-haltige Hautcremes her, die Wirkstoffe in die Epidermis und tiefer gelegene Zellschichten
 transportieren. Eine zielgerichtete Abgabe der von den Liposomen transportierten Wirkstoffe an bestimmte Zellen oder
 ihrer Anreicherung in der Nähe solcher Zielzellen kann in diesem Zusammenhang beispielsweise durch an die Außen-
 membran der Liposomen gekoppelte Antikörper für bestimmte Zelloberflächenstrukturen oder andere "Targeting"-Ein-
 heiten erreicht werden.

30 **[0005]** Zur Herstellung von Liposomen werden hauptsächlich natürliche Lecithine aus Sojabohnen oder Eigelb bzw.
 definierte natürliche oder künstliche Phospholipide, wie Cardiolipin, Sphingomyelin, Lysolecithin und andere verwen-
 det. Durch Variation der polaren Kopfgruppen (Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerin, Inosit), der Länge und der Sätti-
 gungsgrade der Kohlenwasserstoffketten werden Größe, Stabilität und Fähigkeit zur Aufnahme und Freisetzung der as-
 soziierten Moleküle beeinflusst.

35 **[0006]** Einer der wesentlichen Nachteile der heute üblichen Liposomen ist ihre geringe Stabilität. Aus normalen Dop-
 pelschicht-bildenden Phospholipiden gebildete Liposomen sind auch im gekühlten Zustand nur kurze Zeit haltbar. Ihre
 Lagerstabilität läßt sich zwar z. B. durch Einbeziehen von Phosphatidsäure o. α -Tocopherol erhöhen, jedoch ist die somit
 verbesserte Stabilität für viele Zwecke immer noch unzureichend. Außerdem sind herkömmliche Liposomen nicht säu-
 40 restabil und daher weder für den Transport pharmazeutischer Wirkstoffe geeignet, die nach oraler Verabreichung den
 Magen passieren, noch für die Liposomen-unterstützte DNA-Transfektion unter leicht sauren pH-Bedingungen.

[0007] Für wissenschaftliche und medizinische Lipofektionen in Säugerzellen werden Liposomen-bildende Lipidm-
 45 schungen, z. B. Lipofectamin[®], Lipofectin[®] oder DOTAP[®], häufig benutzt. Neben den bereits erwähnten Nachteilen ist
 mit ihrer Anwendung die Notwendigkeit verbunden, eine Vielzahl von Parametern (z. B. Zelldichte, Nukleinsäure-
 menge, Anteil der zugesetzten Lipide, Volumen des Liposomenansatzes etc.) genau zu bestimmen, weil es nur ein sehr
 enges Parameteroptimum gibt, bei dem ausreichende Transfektionseffizienzen erreicht werden können. Dadurch werden
 Transfektionen unter Verwendung kommerzieller Lipofektionsreagenzien sehr aufwendig und kostenintensiv.

[0008] Desweiteren sind bei den oben genannten Produkten große Variationen zwischen den einzelnen Chargen zu be-
 obachten, was sie in der Praxis wenig verlässlich macht.

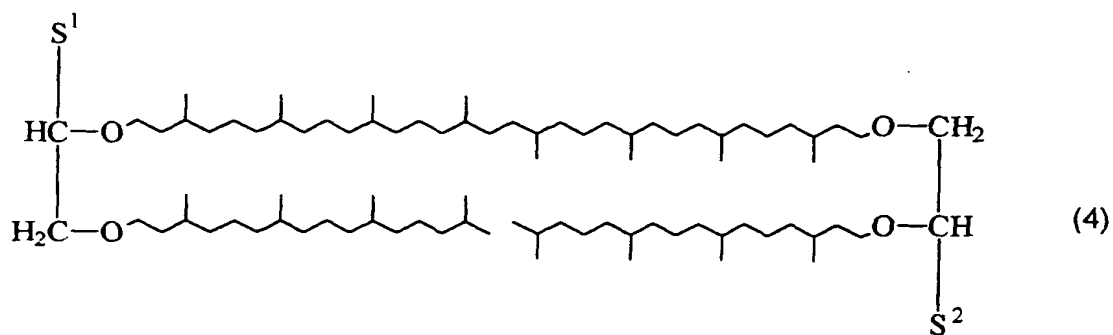
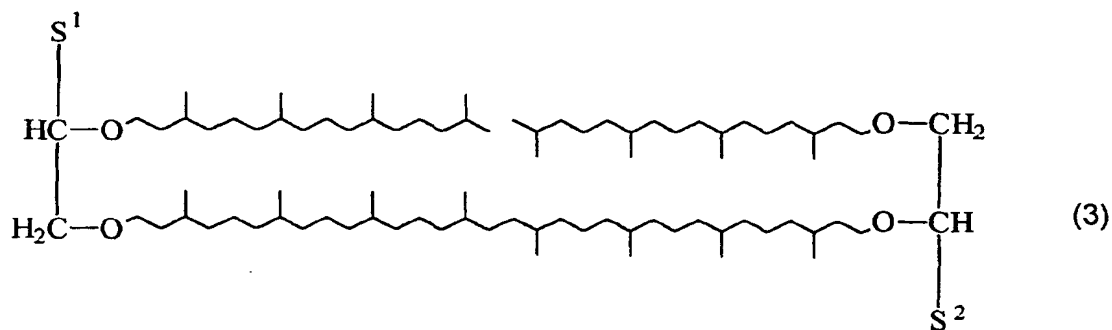
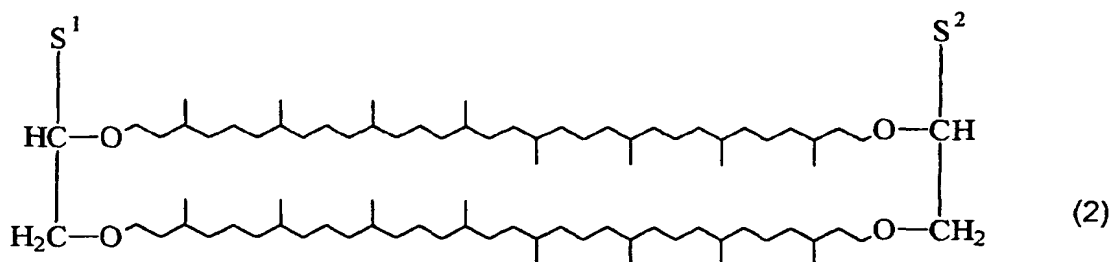
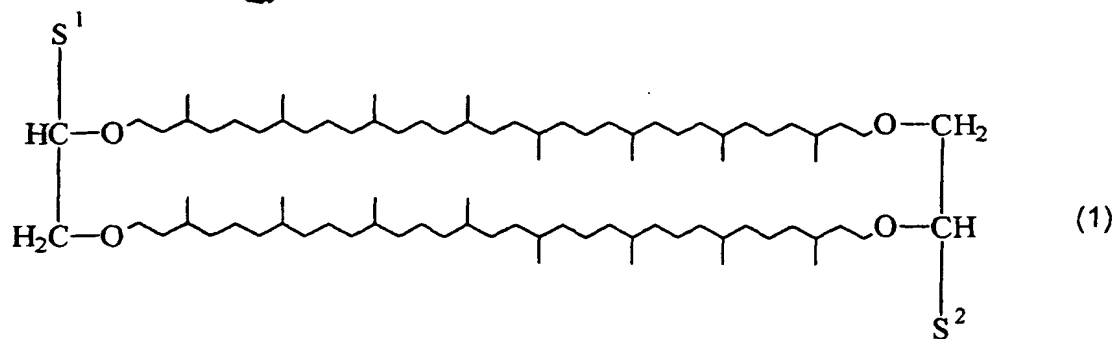
50 **[0009]** Die WO-A-97/31927 beschreibt ein Tetraetherlipidderivat, das eine Seitenkette mit einem modifizierten oder
 unmodifizierten Guloserest oder einem Oxidationsprodukt einer solchen Glucose umfasst, sowie dieses Tetraetherlipidde-
 rivat enthaltende Liposomen, die sich durch eine verbesserte Beständigkeit gegenüber Säuren und durch eine verbesserte
 Lagerstabilität auszeichnen.

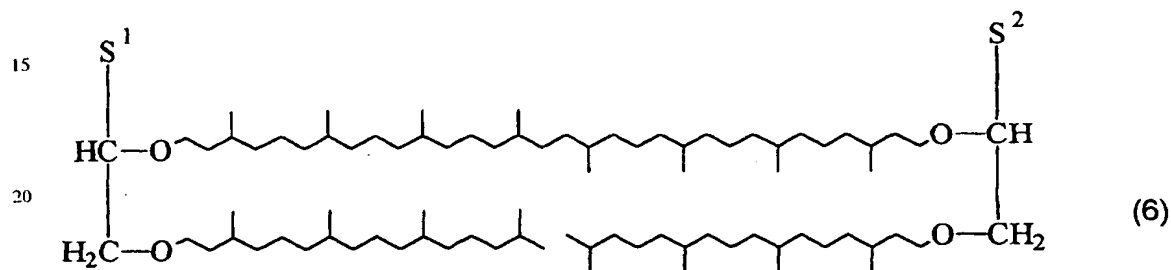
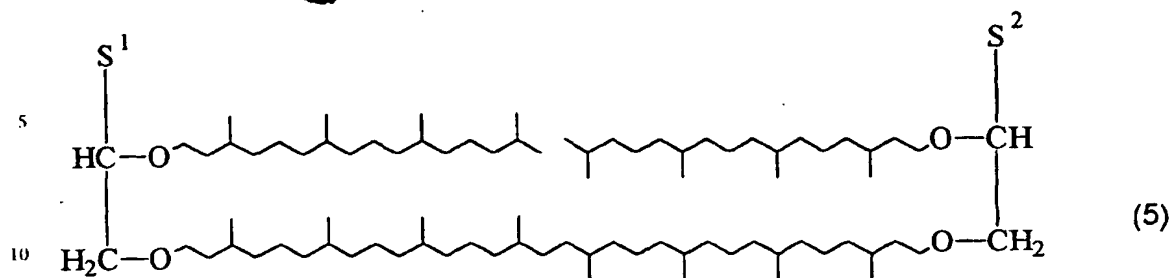
[0010] Das US-Patent 5098588 beschreibt die Herstellung von Tetraetherlipidderivaten mit polaren Seitenketten und
 deren Verwendung als Grenzflächenschnittmittel.

55 **[0011]** Die DE-A-197 36 592 beschreibt Tetraetherlipidderivate mit Seitenketten, die entweder per se durch Ausbil-
 dung quaternärer Ammoniumsalze oder unter physiologischen Bedingungen positiv geladen sind. Solcherart derivati-
 sierte Lipide sind geeignet, mit negativ geladenen Molekülen, beispielsweise Nukleinsäuremolekülen, in Kontakt zu tre-
 ten und sie z. B. in Liposomen einzuschließen.

60 **[0012]** Es besteht jedoch nach wie vor ein Bedarf für Lipide, die die Erzeugung von hinsichtlich ihrer in vivo Stabilität
 oder Lagerstabilität verbesserten Liposomen ermöglichen. Weiter besteht ein Bedarf nach Lipiden, die neben einer er-
 höhten Stabilität eine verbesserte Möglichkeit zur gegebenenfalls gezielten Abgabe von Wirkstoff aus den sie integrie-
 renden Liposomen bieten. Aufgabe der Erfindung ist es daher, Lipide bereitzustellen, die sich zur Bildung von Liposo-
 men eignen und eine verbesserte Stabilität aufweisen und/oder eine gezielte Wirkstoffabgabe erlauben.

65 **[0013]** Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch das Bereitstellen von Tetraetherlipidderivaten (im folgenden
 auch als "TEL-Derivate" abgekürzt), dargestellt durch eine der folgenden allgemeinen Formeln (1) bis (6):





25 wobei S¹ und S² unabhängig voneinander ausgewählt sind aus den Gruppen

-CH₂-O(PO₂⁻)OH

und

30

-A-X¹-B-(X²)q-Y

worin bedeuten:

35 A -CONR¹-, -COO-, -CH₂O-, -CH₂OCO-, -CH₂NR¹CO-, -CH₂OCONR¹-, -CH₂NR¹COO-, -CH₂O(PO₂⁻)O- oder -CH₂S-,

X¹ und X² unabhängig voneinander eine verzweigte oder unverzweigte Alkyl- oder Alkenylengruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, die Gruppe -COCR¹Y(CH₂)m- oder die Gruppe -CH₂-CH₂-NHCO-,

B -(O(CH₂)m)n-, -(NR¹COCHN(R¹)₂)₆- oder -(NR⁶)p-,

Y -H-, -NR²R³-, -N⁺R²R³R⁴-, -OR⁵-, -COR⁷ oder -SR⁸,

40 R¹ und R⁶ -H, eine verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkyl-, Aralkyl- oder Arylgruppe mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei diese Gruppen mit mindestens einer Gruppe Y substituiert sein können,

R² bis R⁵,

R⁷ und R⁸ unabhängig voneinander R¹ oder -(C=N⁺H₂)NH₂,

m 1 bis 5,

45 n 0 bis 150,

o 0 bis 10,

p 0 oder 1 und

q 0 bis 5,

50 wobei jeweils einer der Reste R² bis R⁵, R⁷ und R⁸ weiter einen Liganden umfassen kann, der über einen Spacer an das Lipid gebunden sein kann,

sowie durch Bildung von Pentazyklen im Tetraethergrundgerüst gebildete Modifikationen davon,

mit der Maßgabe, dass wenn das Tetraetherlipidderivat durch die allgemeine Formel (I) dargestellt ist, folgende Verbindungen ausgenommen sind:

55 A = -CONH-, B = -(NR⁶)p- mit p = 1 und R⁶ = -H oder eine verzweigte oder unverzweigte unsubstituierte Alkyl-, Alkyl-, Aralkyl- oder Arylgruppe mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen;

A = -CONH-, n = o = p = q = 0 und Y = -NR²R³ oder -N⁺R²R³R⁴; und

A = -CH₂NHCO- oder -CONH-, n = o = p = q = 0 und Y = -H.

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls Liposomen und Lipidagglomerate bereit, die mindestens eines der zuvor genannten Tetraetherlipidderivate enthalten.

60 [0015] Das Lipidgerüst der erfindungsgemäßen cyclischen Tetraetherlipidderivate besteht aus einem 72-gliedrigen Makrotetraetherzyklus. Dieser besteht aus zwei Dibiphytanyl-Ketten, deren endständige Kohlenstoffatome über zwei Ethylendioxy-Einheiten (-O-CH₂-CH₂-O-) miteinander verknüpft sind. Jeweils ein Kohlenstoffatom jeder Ethylen-Einheit ist mit einer Gruppe S substituiert. Tetraetherlipide sind bereits bekannt und bisher ausschließlich in Archaeobakterien nachgewiesen worden. In Abhängigkeit z. B. von der Züchtungstemperatur können sich innerhalb der Dibiphytanylketten Pentazyklen ausbilden, die dem Lipid einen spezifischen physiko-chemischen Charakter geben. Mit jeder Pentazyklisierung verliert das Grundgerüst zwei Wasserstoffatome. Eine Zusammenfassung aller bisher bekannten Basisstrukturen archaebakterieller Lipide ist in Langworthy und Pond (System Appl. Microbiol. 7, 253-257, 1986) enthalten.

65 [0016] Das natürlich vorkommende Lipidgerüst ist nunmehr erfindungsgemäß derivatisiert worden, um für den Einbau

in zur Transfektion oder zur Wirkstoffabgabe vorgesehene Liposomen oder Lipidagglomerate mit verbesserten Eigenschaften bezüglich Transfektion und Stabilität geeignet zu sein. Dazu werden spezielle Seitenketten eingeführt. Einige der solcherart derivatisierten Lipide sind besonders gut geeignet, mit negativ geladenen Molekülen, beispielsweise Nukleinsäuremolekülen, in Kontakt zu treten und sie z. B. in Liposomen einzuschließen. Da ein möglicher Verwendungszweck der erfindungsgemäßen Lipide in der Bildung von Liposomen oder Lipidagglomeraten für pharmako- und/oder 5
 gentherapeutische Anwendungen liegt, können die erfindungsgemäßen Lipide zusätzlich mit Molekülen gekoppelt werden, die das spezifische Andocken der Lipide an spezielle Zellen ermöglichen. Beispiele dafür sind Antikörper gegen Zelloberflächenantigene, insbesondere solche, die selektiv auf den Zielzellen exprimiert werden. Möglich sind weiter Li- 10
 ganden für Rezeptoren, die auf der Oberfläche bestimmter Zellen selektiv anzutreffen sind, sowie biologisch aktive Peptide, die ein Organ- bzw. Zell-spezifisches Targeting in vivo ermöglichen (Ruoslati, Science, 276, 1345-46, 30.5. 1997).
[0017] Der besondere Vorteil der erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate liegt in ihrer verbesserten Stabilität. Da das Lipidgerüst der erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate keine Doppelbindungen enthält, sind sie unempfindlich gegen Oxidation. Weiterhin enthalten die erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate statt der in Lipiden aus Eubakterien und Eukaryonten enthaltenen Lipidesterbindungen nur Lipidetherbindungen, die auch bei hohen Protonenkonzentrationen, wie sie z. B. im Magen auftreten, nicht angegriffen werden. 15
[0018] Die erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate werden im Folgenden genau beschrieben.
[0019] Die Gruppen S^1 und S^2 können gleich oder verschieden voneinander sein und sind ausgewählt aus den Gruppen

$-\text{CH}_2-\text{O}(\text{PO}_2^-)\text{OH}$

und

$-\text{A}-\text{X}^1-\text{B}-(\text{X}^2)_q-\text{Y}$

worin bedeuten:

A $-\text{CONR}^1-$, $-\text{COO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$, $-\text{CH}_2\text{NR}^1\text{CO}-$, $-\text{CH}_2\text{OCONR}^1-$, $-\text{CH}_2\text{NR}^1\text{COO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{PO}_2^-)\text{O}-$ oder $-\text{CH}_2\text{S}-$, 25

X^1 und X^2 unabhängig voneinander eine verzweigte oder unverzweigte Alkyl- oder Alkenylengruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, die Gruppe $-\text{COCR}^1\text{Y}(\text{CH}_2)_m-$ oder die Gruppe $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHCO}-$, 30

B $-(\text{O}(\text{CH}_2)_m)_n$, $-(\text{NR}^1\text{COCHN}(\text{R}^1)_2)_o-$ oder $-(\text{NR}^6)_p$,

Y $-\text{H}$, $-\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{N}^+\text{R}^2\text{R}^3\text{R}^4$, $-\text{OR}^5$, $-\text{COR}^7$ oder $-\text{SR}^8$,

R^1 und R^6 $-\text{H}$, eine verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkyl-, Aralkyl- oder Arylgruppe mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei diese Gruppen mit mindestens einer Gruppe Y substituiert sein können, 35

R^2 bis R^5 ,
 R^7 und R^8 unabhängig voneinander R^1 oder $-(\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2)\text{NH}_2$,

m 1 bis 5,

n 0 bis 150,

o 0 bis 10,

p 0 oder 1 und

q 0 bis 5,

wobei jeweils einer der Reste R^2 bis R^5 , R^7 und R^8 weiter einen Liganden umfassen kann, der über einen Spacer an das Lipid gebunden sein kann. 40

[0020] In einer bevorzugten Ausführungsform ist A ausgewählt aus den Gruppen $-\text{CONH}-$ und $-\text{CH}_2\text{O}(\text{PO}_2^-)\text{O}-$. Wenn A $-\text{CONH}-$ bedeutet, ist B bevorzugt $-(\text{O}(\text{CH}_2)_2)_n-$, wobei n bevorzugt eine Zahl im Bereich von 3 bis 130 und besonders bevorzugt eine Zahl im Bereich von 40 bis 85 ist. 45

[0021] Die Gruppen X^1 und X^2 sind bevorzugt geradkettige Alkylengruppen mit 1 bis 12, bevorzugt mit 1 bis 6 und besonders bevorzugt mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispiele für bevorzugte Gruppen umfassen $-(\text{CH}_2)_2-$, $-(\text{CH}_2)_3-$ und $-(\text{CH}_2)_4-$. 50

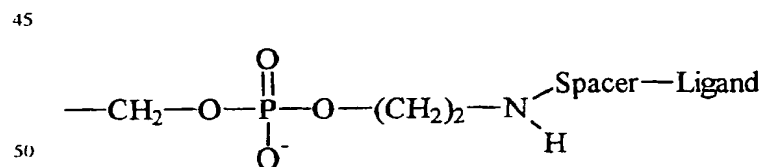
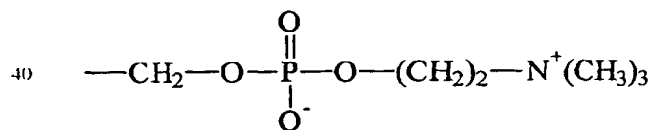
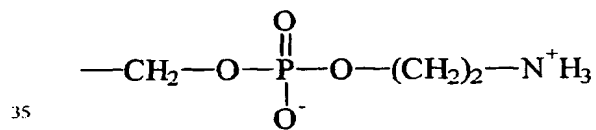
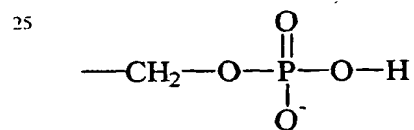
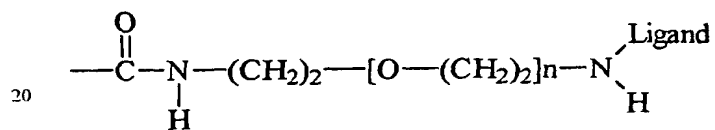
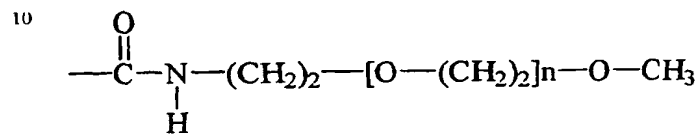
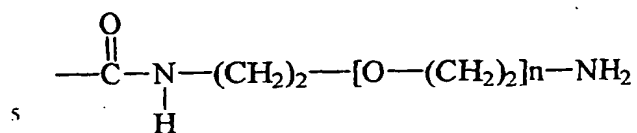
[0022] Bevorzugte Gruppen, die durch R^1 und R^6 dargestellt sind, umfassen Wasserstoff und Alkylgruppen mit 1 bis 6, besonders bevorzugt mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, wie z. B. eine Methylgruppe, eine Ethylgruppe oder eine n-Propylgruppe, die mit mindestens einer Gruppe Y substituiert sein können. Besonders bevorzugte Beispiele für die substituierten und unsubstituierten Alkylgruppen, die durch R^1 und R^6 dargestellt sind, umfassen $-\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ und $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$. 55

[0023] Bevorzugte Beispiele für die Gruppen, die durch R^2 bis R^5 , R^7 und R^8 dargestellt sind, umfassen die bevorzugten Gruppen, die für R^1 genannt wurden, sowie die Gruppe $-(\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2)\text{NH}_2$. 60

[0024] o ist bevorzugt eine Zahl im Bereich von 0 bis 3, besonders bevorzugt 0 oder 1.

[0025] q ist bevorzugt 0 oder 1.

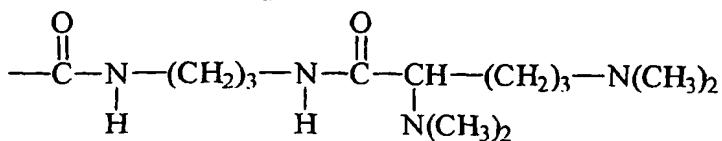
[0026] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind S^1 und S^2 unabhängig voneinander ausgewählt aus den folgenden Gruppen (I) bis (XII): 65



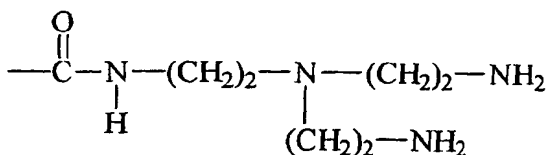
40

45

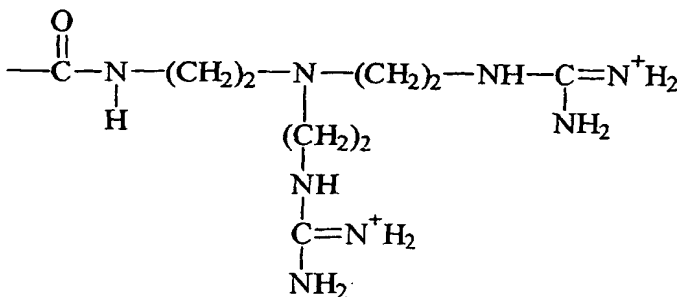
50



5



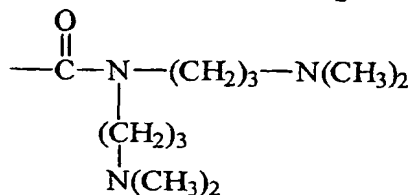
10



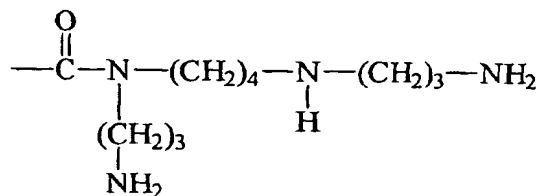
15

20

25



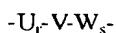
30



35

40

[0027] Der Spacer ist bevorzugt eine zweiwertige Verbindungsgruppe, die durch die folgende allgemeine Formel dargestellt ist:

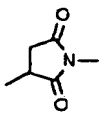


45

worin bedeuten:

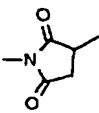
U eine Gruppe, die an das Lipid gekoppelt ist und die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus -O-, -S-, -CO-, -COO-, -CONH-, -CSNH-, -(CN⁺H₂)-, -NH- und

50



55

W eine Gruppe, die an den Liganden gekoppelt ist und die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus -O-, -S-, -CO-, -OCO-, -NHCO-, -NHCS-, -(CN⁺H₂)₂-, -NH- und



60

V (a) eine verzweigte oder unverzweigte Alkylenkette mit 1 bis 30, bevorzugt mit 1 bis 18 und besonders bevorzugt mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei die Kohlenstoffatome teilweise durch die Gruppen -S-S-, -CO-, -CH(OH)-, -NHCO-, -CONH-, Cyclohexylen, Phenylen, -C⁺OO-, -OCO-, -SO₂-, -O- oder -CH(CH₃)- ersetzt sein können, und/oder
(b) eine Polyethylen/propylenglycolkette mit mindestens 3 Ethylen/propylenglycoleinheiten, und/oder

65

- (c) eine Polyethylen/propylenaminkette mit mindestens 3 Ethylen/propylenamineinheiten, und/oder
- (d) eine Kohlenhydratkette, und/oder
- (e) eine Oligopeptidkette und/oder
- (f) eine Polylactidkette,

5 r 0 oder 1 und

s 0 oder 1.

[0028] Bevorzugte Verknüpfungsgruppen zwischen Lipid und Ligand sind im Folgenden aufgeführt.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

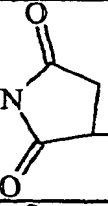

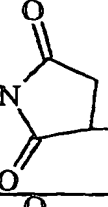
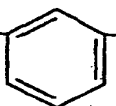
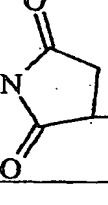
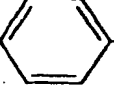
55

60

65

Lipid	Spacer	Ligand	
—NH—CO—	—*—	—CO—NH—	5
—NH—COO—	—*—	—OCO—NH—	10
—CO—NH—	—*—	—NH—CO—	15
—O—CO—	—*—	—CO—O—	20
—O—CONH—	—*—	—NHCO—O—	25
—NH—CONH—	—*—	—NHCO—NH—	30
—NH—CSNH—	—*—	—NHCS—NH—	35
$\text{—NH—(C=N}^+\text{H}_2\text{)—}$	—*—	$\text{—(C=N}^+\text{H}_2\text{)—NH—}$	40
			45
			50
			55
			60

65

Lipid	Spacer	Ligand
5 —NH—	* —	—NH—
10 —NH—CO—	* —NHCOCH ₂ —N— 	—S—
15 —NH—CO—	* —NHCO—  —CH ₂ —N— 	—S—
20 —NH—CO—	* —NHCO—  —N— 	—S—
25 —NH—CO—	* —NHCO—  —CH(CH ₃)—S—S—	—S—
30 —NH—CO—	* —NHCO—CH ₂ —S—	—S—
35 —NH—CO—	* —NHCO—CH ₂ CH ₂ —S—S—	—S—
40 —CO—O—	* —O—CO—	—CO—

65 [0029] worin * eine zweiwertige Verbindungsgruppe ist. Bevorzugte Beispiele für die zweiwertige Verbindungsgruppe umfassen (a) eine verzweigte oder unverzweigte Alkylkette mit 1 bis 30, bevorzugt mit 1 bis 18 und besonders bevorzugt mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei die Kohlenstoffatome teilweise durch die Gruppen -S-S-, -CO-, -CH(OH)-, -NHCO-, -CONH-, Cyclohexylen, Phenylen, -COO-, -OCO-, -SO₂-, -O- oder -CH(CH₃)-ersetzt sein können, (b) eine Po-

lyethylen/propylenglycolkette mit mindestens 3 Äthylen-/propylenglycoleinheiten, die verzweigt sein kann, (c) eine Polyethylen/propylenaminkette mit mindestens 3 Äthylen/propylenamineinheiten, die verzweigt sein kann, (d) eine oligomere oder polymere Kohlenhydratkette, (e) eine Peptidkette, bevorzugt eine Oligopeptidkette mit 5 bis 50 Aminosäuren, bevorzugt mit 5 bis 15 Aminosäuren, (f) eine Polylactidkette, (g) eine Poly(acrylmorpholin)kette, (h) eine Poly(vinylpyrrolidon)kette und (i) eine Poly(acrylamid)kette. Besonders bevorzugte Beispiele für die zweiwertige Verbindungsgruppe umfassen die Gruppen $-\text{CO}(\text{CH}_2)_4\text{CO}-$, $-(\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2)(\text{CH}_2)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_2(\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2)-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_6\text{SS}(\text{CH}_2)_5\text{CO}-$, $-\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CO}-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ und $-\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_2(\text{CH}_2)_2\text{OCO}-$.

[0030] Die Materialien, die verwendet werden können, um einen Spacer in die erfindungsgemäßen Tetraetherlipide einzuführen, umfassen handelsüblich erhältliche Produkte. Beispielsweise können die Produkte AEDP (Produktnr. 22101ZZ), AMAS (Produktnr. 22295ZZ), BMB (Produktnr. 22331ZZ), BMDB (Produktnr. 22332ZZ), BMH (Produktnr. 22330ZZ), BMOE (Produktnr. 22323ZZ), BMPA (Produktnr. 22296ZZ), BMPH (Produktnr. 22297ZZ), BMPs (Produktnr. 22298ZZ), BM[PEO]₃ (Produktnr. 22336ZZ), BM[PEO]₄ (Produktnr. 22337ZZ), DMA (Produktnr. 20663ZZ), DMP (Produktnr. 21666ZZ), DMS (Produktnr. 20700ZZ), DPIP (Produktnr. 21702ZZ), DSG (Produktnr. 20593ZZ), DSP (Produktnr. 22585ZZ), DSS (Produktnr. 21555ZZ), DST (Produktnr. 20589ZZ), DTBP (Produktnr. 20665ZZ), DTME (Produktnr. 22335ZZ), DTSSP (Produktnr. 21578ZZ), EDC (Produktnr. 22980ZZ), EGS (Produktnr. 21565ZZ), EMCA (Produktnr. 22306ZZ), EMCS (Produktnr. 22308ZZ), GMBS (Produktnr. 22309ZZ), KMUA (Produktnr. 22211ZZ), LC-SMCC (Produktnr. 22362ZZ), LC-SPDP (Produktnr. 21651ZZ), MBS (Produktnr. 22311ZZ), MSA (Produktnr. 22605ZZ), PMPI (Produktnr. 28100ZZ), SATA (Produktnr. 26102ZZ), SATP (Produktnr. 26100ZZ), SBAP (22339ZZ), SIA (Produktnr. 22349ZZ), SIAB (Produktnr. 22329ZZ), SMCC (Produktnr. 22360ZZ), SMPB (Produktnr. 22416ZZ), SMPH (Produktnr. 22363ZZ), SMPT (Produktnr. 21558ZZ), SPDP (Produktnr. 21857ZZ), Sulfo-BSOCOES (Produktnr. 21556ZZ), Sulfo-LC-SMPT (Produktnr. 21568ZZ) und TFCs (Produktnr. 22299ZZ) der Firma PIERCE (die Produktnummern wurden dem Produktkatalog 1999/2000 entnommen) eingesetzt werden.

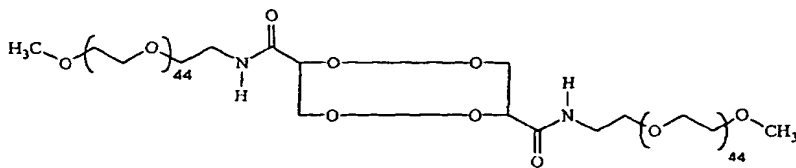
[0031] Die Gruppen S¹ und S² können Polyethylenglycolketten enthalten. Die Materialien, die verwendet werden können, um Polyethylenglycolketten in die erfindungsgemäßen Tetraetherlipide einzuführen, umfassen handelsüblich erhältliche Produkte. Polyethylenglycolketten werden z. B. mit durchschnittlichen Molmassen von 500 g/mol (durchschnittlich 11 Äthylenglycoleinheiten), 1000 g/mol (durchschnittlich 23 Äthylenglycoleinheiten), 2000 g/mol (durchschnittlich 45 Äthylenglycoleinheiten), 3400 g/mol (durchschnittlich 77 Äthylenglycoleinheiten) und 5000 g/mol (durchschnittlich 114 Äthylenglycoleinheiten) angeboten. Diese Materialien werden erfindungsgemäß bevorzugt verwendet.

[0032] Die Zirkulationszeit von Liposomen im Blut läßt sich durch den Einbau von Lipiden mit Polyethylenglycolketten (PEG-Ketten) erhöhen, d. h. Liposomen, die solche pegylierten Lipide enthalten, haben eine höhere Lebensdauer in vivo als Liposomen mit nicht pegylierten Lipiden. Einerseits wird die Opsonisierung der Vesikel verhindert und dadurch die Erkennung durch das retikuloendotheliale System. Zum anderen wird auch die Entfernung der einzelnen Lipide durch HDL-Komplexe unterdrückt. Die PEG-Ketten besitzen vorzugsweise Molgewichte von 2000, 3400 oder 5000 Masseneinheiten.

[0033] Es hat sich gezeigt, daß die Zirkulationszeit am höchsten ist, wenn das pegylierte Lipid gut in der Liposomen-Membran verankert ist. Dabei ist es bevorzugt, daß die Bindung zwischen dem Lipid und dem PEG-Teil eine hohe Stabilität besitzt.

[0034] Überraschenderweise hat sich nunmehr gezeigt, dass die Zirkulationszeit von Liposomen im Blut durch den Ersatz von pegylierten Lipiden durch mono- oder bis-pegylierte Tetraetherlipidderivate (TEL-Derivate) signifikant erhöht werden kann.

[0035] Bevorzugt werden hierfür bis-pegylierte TEL-Derivate bereitgestellt. Der Tetraether-Grundkörper ist über Säureamid-Funktionen mit zwei Molekülen PEG, vorzugsweise der Molmasse 2000, verknüpft (II).



[0036] Ein solches Molekül zeigt auf Grund des membranspannenden, hydrophoben Tetraether-Grundgerüsts eine bessere Verankerung in der Liposomen-Membran als z. B. die pegylierten PE(Phosphatidylethanolamin)-Lipide. Außerdem ist ein Entfernen eines solchen bipolaren Lipids aus der Liposomen-Membran auf Grund der zweiten, voluminösen, hydrophilen Kopfgruppe zusätzlich erschwert. Die Verknüpfung zwischen dem TEL-Derivat und den beiden PEG-Ketten erfolgt über relativ stabile Säureamid-Bindungen.

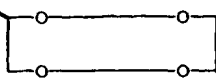
[0037] Durch den Einbau dieses Lipids läßt sich die Zirkulationszeit von Liposomen signifikant erhöhen.

[0038] Alternativ können die PEG-Ketten durch Poly(acrylmorpholin), Poly(vinylpyrrolidon) oder Ganglioside ersetzt werden.

[0039] Bei herkömmlichen langzirkulierenden Liposomen stellt der Verlust von Targetspezifischen Liganden ein Problem dar. Eine Verbesserung läßt sich erreichen, wenn man die Targetspezifischen Liganden an die PEG-Enden der pegylierten TEL koppelt. Denn die TEL-Derivate weisen auf Grund der membranspannenden Lipide eine bessere Verankerung auf. Dies stellt einen weiteren Vorteil bei der Verwendung in langzirkulierenden Liposomen dar.

Ligand-hydrophiles Polymer-Y-(X₂)_q-B-X₁-A

5

A-X₁-B-(X₂)_q-Y-hydrophiles Polymer-Ligand

[0040] Die erfindungsgemäßen Tetraetherlipid-Ligand-Konjugate sind hervorragend für zellspezifisches Targeting mit Hilfe lang zirkulierender Liposomen geeignet.

10 [0041] Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Tetraetherlipid-Ligand-Konjugate zur Membranverankerung von Lipopeptiden mit großen hydrophilen Liganden geeignet, die eine große Tendenz haben, in die wäßrige Phase überzugehen.

[0042] Bevorzugte Liganden sind solche, die aus der Gruppe, bestehend aus Proteinen, Peptiden, Vitaminen, Kohlenhydraten und Peptidomimetika, ausgewählt sind. Das Protein ist bevorzugt ein Antikörper, ein Fragment eines Antikörpers (Fab, F(ab)₂ oder Fv), Lectin oder ein Apo-Lipoprotein oder ein an einen Zelloberflächenrezeptor bindendes Protein. Bei den Peptiden handelt es sich bevorzugt um Peptide mit 5 bis 15 Aminosäuren. Weitere bevorzugte Peptide sind EILDV, CDCRGDCFC und CNGRG. Bei den Vitaminen kann es sich um jedes essentielle oder nicht essentielle Vitamin handeln. Bevorzugte Vitamine sind Vitamin B12 oder Folsäure. Bei den Kohlenhydraten sind besonders bevorzugt z. B. Galactose, Lactose, Mannose oder Sialyl-Lewis-X. Erfindungsgemäß können weiterhin Peptidomimetika als Liganden eingesetzt werden; hier werden bevorzugt α₁β₃-spezifische Diazepin-Derivate oder para-Hydroxybenzoesäureamid-Derivate verwendet.

20 [0043] Der Ligand kann beispielsweise eine Peptidsequenz enthalten, ausgewählt aus CDCRGDCFC (über zwei Disulfidbrücken cyclisiert), EILDV, CNGRG (über eine Disulfidbrücke cyclisiert), -c(RGDfK)- (über eine Amidbindung cyclisiert), Peptidsequenzen aus dem Circumsporoziten-Protein und Peptidsequenzen aus Transferrin.

25 [0044] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Substituenten S¹ und S² an beiden Enden des Tetraetherlipidgrundgerüsts gleich. Dies ermöglicht, ausgehend von natürlichen Tetraetherlipiden, die Synthese ohne zwischenzeitliche Verwendung von Schutzgruppen.

[0045] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform sind die Substituenten S¹ und S² an beiden Enden des Tetraetherlipidgrundgerüsts verschieden. Besonders bevorzugte Ausführungsformen umfassen solche, in denen (a) S¹ eine kationische Gruppe und S² einen Liganden umfasst, (b) S¹ eine neutrale Gruppe und S² einen Liganden umfasst und (c) S¹ eine anionische Gruppe und S² einen Liganden umfasst. Diese Bifunktionalität der erfindungsgemäßen Tetraetherlipid-derivate, die die Anbindung eines möglicherweise für das "Targeting" verantwortlichen Liganden draußen und einer Substratbindungsstelle im Inneren eines Liposoms ermöglicht, eröffnet ungeahnte therapeutische Möglichkeiten.

30 [0046] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls eine Zusammensetzung bereit, enthaltend zwei, drei, vier, fünf oder mehr der erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate und gegebenenfalls physiologisch verträgliche Zusatzstoffe.

35 [0047] Die erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate werden bevorzugt aus natürlichen Tetraetherlipiden hergestellt, die z. B. aus Archaeobakterien isolierbar sind. Wie bereits erwähnt, treten in den aus natürlichen Quellen isolierten Tetraetherlipiden in einem gewissen Umfang Pentazyklen innerhalb der Dibiphytanylketten auf. Das Ausmaß der Pentazyklisierung kann durch die Züchtungstemperatur beeinflusst werden. Normalerweise finden sich 0 bis 8 Pentazyklen pro Tetraethergrundgerüst, wobei bei einer Züchtungstemperatur von 39° die meisten Lipidmoleküle zwischen 1 und 5 Pentazyklen aufweisen, während bei einer Züchtungstemperatur von 59° überwiegend 3 bis 6 Pentazyklen beobachtet werden. Die folgende Tabelle gibt Auskunft über die Verteilung der Pentazyklisierung in Tetraetherlipiden aus *Thermoplasma acidophilum* bei einer Züchtungstemperatur von 39°C bzw. 59°C:

Anzahl der Pentazyklen	%-Anteil bei Züchtungs- temperatur von 39°	%-Anteil bei Züchtungs- temperatur von 59°C
0	5,5 ± 0,5	6,6 ± 0,5
1	17,3 ± 0,4	9,2 ± 1,2
2	23,0 ± 4,0	9,4 ± 0,05
3	23,4 ± 0,5	17,1 ± 1,4
4	14,8 ± 1,3	19,0 ± 1,3
5	10,8 ± 1,0	21,6 ± 0,3
6	3,6 ± 0,0	11,7 ± 0,2
7	1,2 ± 0,5	4,7 ± 0,3
8	0,5 ± 0,4	0,8 ± 0,3

60 [0048] Die erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate können z. B. aus dem Gesamtlipidextrakt von Archaeobakterien, z. B. dem Gesamtlipidextrakt des Archaeobakteriums *Sulfolobus acidocaldarius*, dem Gesamtlipidextrakt des Archaeobakteriums *Sulfolobus solfataricus* oder dem Gesamtlipidextrakt des Archaeobakteriums *Thermoplasma acidophilum*, gewonnen werden. *Sulfolobus acidocaldarius* wurde 1972 in heißen Schwefelquellen im Yellowstone National Park entdeckt. Dieses Archaeobakterium wächst zwischen 60 und 90°C, bei einem Temperaturoptimum von 78°C. Die begrenzenden pH-Werte für das Wachstum liegen zwischen 3,0 und 3,5, wobei das Optimum bei 3,3 liegt. *Sulfolobus acidocaldarius* wächst optimal unter mikroaerophilen Bedingungen, d. h. daß nur eine geringe Sauerstoffkonzentration im Medium toleriert wird; zu hohe O₂-Konzentrationen wirken toxisch. *Sulfolobus acidocaldarius* ist fakultativ chemolithotroph und

bezieht daher seine Energie in natürlichen Habitaten aus der Oxidation von elementarem Schwefel. Da Sulfolobus auch organotroph wachsen können, wird diese Form der Ernährung für die Kultivierung angewendet. Sulfolobus acidocaldarius enthält in seiner Zellmembran Tetraetherlipide, die nur bei Archaeobakterien vorkommen. Die Tetraetherlipide vermitteln besondere Eigenschaften wie pH- und Temperaturstabilität der Zellen, die das Leben der Bakterien unter diesen Bedingungen erst möglich machen.

[0049] Die Ausgangsverbindungen, die zur Herstellung der erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate verwendet werden (z. B. mit Säurechloridgruppen oder mit Hydroxymethylgruppen modifizierte Tetraether), können unter Anwendung herkömmlicher Verfahren aus dem Gesamtlipidextrakt von Archaeobakterien erhalten werden. Solche Verfahren werden z. B. in der WO-A-97/31927 und in der DE-A-197 36 592 beschrieben.

[0050] Die Ausgangsverbindungen, die zur Herstellung der erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate verwendet werden, können natürlich auch synthetisch hergestellt werden. Entsprechende Verfahren werden in T. Eguchi et al., J. Org. Chem. 1998, 63, 2689–2698; K. Arakawa et al., J. Org. Chem. 1998, 63, 4741–4745; sowie in T. Eguchi et al., Chem. Eur. J. 2000, 6, 3351–3358 beschrieben.

[0051] Die erfindungsgemäßen Liposomen und Lipidagglomerate enthalten ein oder mehrere der zuvor beschriebenen Tetraetherlipidderivate. Die Liposomen bzw. Lipidagglomerate können dabei ein oder mehrere Schichten, jeweils enthaltend eine oder mehrere dieser Tetraetherlipidderivate, umfassen.

[0052] Verfahren zum Herstellen von Liposomen sind allgemein bekannt. Generell wird dabei das zur Präparation der Liposomen vorgesehene Lipid zunächst in einem organischen Lösungsmittel gelöst und durch Evaporation ein Lipidfilm gebildet. Der Lipidfilm wird gut getrocknet, um sämtliche Lösungsmittelreste zu entfernen. Anschließend werden die Lipide dieses Filmes in einem geeigneten Puffersystem resuspendiert. Für medizinischpharmazeutische Zwecke eignet sich z. B. physiologische Kochsalzlösung, pH 7,4, jedoch sind andere Puffersysteme (z. B. McIlvaine-Puffer), oder ungepufferte Lösungen, wie z. B. ungepufferte Kalium- oder Natriumchloridlösungen, ebenfalls verwendbar.

[0053] Durch Schütteln mit der Hand können zunächst große multilamellare Vesikel mit einer Größenverteilung im μm -Bereich gebildet werden. Die Bildung dieser Vesikel kann durch Verwendung von zwei Glaskügelchen und/oder eines Ultraschallbades mit geringer Schallintensität erleichtert werden.

[0054] Für die Präparation von unilamellaren Liposomen definierter Größe werden folgende Methoden als für die Herstellung von Liposomen aus erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivaten für geeignet gehalten:

(a) Ultraschallbehandlung: Die Suspension multilamellarer Liposomen wird bei 20 kHz 5 Minuten beschallt (Branson Sonifer B 15). Es bilden sich Liposomen mit einem Durchmesser um 500 nm.

(b) Extrusion durch eine French Druckzelle: Die Suspension multilamellarer Liposomen wird bei 16000 p. s. i. viermal in der French Druckzelle extrudiert (SLM-Aminco Inc., Urbana IL, USA). Es bilden sich Liposomen mit einem Durchmesser um 120 nm.

(c) Extrusion durch Polycarbonatfilter: Die Suspension multilamellarer Liposomen wird durch Polycarbonatfilter definierter Porengröße extrudiert (LiposoFastTM, Avestin, Ottawa, Kanada). Bei Verwendung von Filtern mit einer Porengröße von 100 oder 200 nm entstehen Liposomen, die in der Größenverteilung geringfügig oberhalb der Porengröße liegen. Die Extrusion durch Filter dieser geringen Porengröße kann gleichzeitig als Sterilfiltration dienen, sofern alle sonstigen Voraussetzungen für eine Sterilfiltration (z. B. exakte Trennung der unsterilen und sterilen Seiten der Filtrationsapparatur) eingehalten werden. Um die eigentliche Filtration zu erleichtern, können einige Vorbehandlungen getroffen werden:

(ca) Die Suspension multilamellarer Liposomen wird bei 20 kHz zwischen 1 und 5 Minuten beschallt (s. (a)).

(cb) Die Suspension multilamellarer Liposomen wird 1–3 mal gefroren und wieder aufgetaut.

(cc) Die Suspension multilamellarer Liposomen nach (ca) oder (cb) wird durch einen Polycarbonatfilter von 600 bis 800 nm Porengröße vorfiltriert.

[0055] Im Anschluß an die Ultraschallbehandlung bzw. Extrusion können die Liposomen in einer Eppendorffzentrifuge 3200 10 Minuten zentrifugiert werden, um nichtliposomales Material zu entfernen. Intakte, geschlossene Vesikel bleiben im Überstand.

[0056] Liposomen können weiter durch Detergenzsolubilisierung mit anschließender Detergenzdialyse hergestellt werden. Dazu wird zunächst wie oben beschrieben ein Lipidfilm gebildet. Dieser wird in einem detergenzhaltigen Puffersystem suspendiert (Beispiele dialysierbarer Detergenzien: Octyl- β -D-Glucopyranosid oder Octyl- β -D-Thioglucopyranosid). Das molare Verhältnis (TEL-Derivat: Detergenz) sollte bei den genannten Detergenzien zwischen 0,05 und 0,3 liegen und die Puffermenge so berechnet sein, daß sich später eine Liposomendispersion mit maximal 15–20 mg Lipid pro ml Puffer ergibt. Durch Schütteln mit der Hand werden Mischmizellen aus Detergenz und TEL-Derivat gebildet.

[0057] Die Suspension der Mischmizellen wird nun in Dialyseschläuche, z. B. in eine Lipoprep[®]-Dialysezelle oder in eine Mini-Lipoprep[®] Dialysezelle (Diachema AG, Langnau, Schweiz) übertragen und bei RT 24 Stunden dialysiert. Bei Entzug des Detergenz durch die Dialyse bilden sich aus den Mischmizellen Liposomen von etwa 400 nm Durchmesser.

[0058] Die Liposomen-Präparation kann in einer Eppendorffzentrifuge 3200 10 Minuten zentrifugiert werden, um nichtliposomales Material zu entfernen. Intakte, geschlossene Vesikel bleiben im Überstand.

[0059] Eine bevorzugtes Protokoll einer Liposomen-Präparation durch Detergenz-Dialyse, bei dem Detergenz Natrium-Cholat verwendet wird, ist in den Beispielen beschrieben.

[0060] Liposomen, die überwiegend die erfindungsgemäßen TEL-Derivate enthalten oder deren Lipidschicht 100%ig aus TEL-Derivaten besteht, haben sich dabei als außergewöhnlich stabil, nahezu unbegrenzt lagerfähig und protonenundurchlässig erwiesen. Ihre Lipiddoppelschichten sind rigider. Für viele Anwendungen, darunter die Formulierung von Pharmazeutika mit säurelabilen Wirkstoffen, und die Transfektion von Eukaryontenzellen, stellen reine TEL-Derivat-Liposomen daher das Mittel der Wahl dar.

[0061] Als vorteilhaft hat sich auch die Herstellung von Liposomen erwiesen, die neben einem Anteil von TEL-Derivat übliche Doppelschicht-bildende Phospholipide enthalten. Auch durch ihre Lipiddoppelschichten sind rigider und we-

niger durchlässig als die herkömmlicher Liposomen. Die Herstellung von Mischliposomen erfolgt analog der Herstellung von reinen TEL-Derivat-Liposomen. Bevorzugte Doppelschicht-bildende Phospholipide, die erfindungsgemäß verwendet werden, umfassen Doppelschicht-bildende kationische, neutrale oder anionische Lipide. Beispielsweise können die erfindungsgemäßen Liposomen und Lipidagglomerate das kationische Lipid DOTAP® (Roche Diagnostics, Deutschland) und/oder DOSPER® (Roche Diagnostics, Deutschland) und/oder DC-Chol® enthalten. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthalten die erfindungsgemäßen Liposomen und Lipidagglomerate die neutralen Lipide Phosphatidylcholin und/oder Phosphatidylethanolamin und/oder Phosphatidylglycerol und/oder Phosphatidylserin und/oder Phosphatidsäure und/oder Cholesterin und/oder Sphingomyelin.

[0062] Das Gew.-Verhältnis von Tetraetherlipidderivat zu weiteren Lipiden in den erfindungsgemäßen Liposomen und Lipidagglomeraten beträgt bevorzugt 5 : 1 bis 1 : 100.

[0063] Die erfindungsgemäßen Liposomen und Lipidagglomerate können weiterhin Nukleinsäuremoleküle und/oder Nukleinsäuremolekül-analoge Verbindungen (wie z. B. Phosphorothioat) und gegebenenfalls Polykationen enthalten. Bevorzugte Polykationen umfassen Polyethylenimin, Poly-Lysin und Protamin.

[0064] Die erfindungsgemäßen Liposomen einschließlich der Mischliposomen sowie die Lipidagglomerate einschließlich der Mischagglomerate können als Transportvehikel für Nukleinsäuren und/oder kosmetische und/oder pharmazeutische Wirkstoffe dienen. Pharmazeutische Wirkstoffe können z. B. Antibiotika, Cytostatika oder Wachstumsfaktoren sein. Die pharmazeutischen Wirkstoffe können synthetisch oder rekombinant hergestellt werden. Sie können weitere Modifikationen aufweisen, wie z. B. Glykosylierung, Acetylierung oder Amidierung. "Mischliposomen" und "Misch-Lipidagglomerate" umfassen zusätzlich herkömmliche Phospholipide. Die erfindungsgemäßen Liposomen und Lipidagglomerate ermöglichen darüber hinaus einen zielgerichteten Gentransfer bzw. eine zielgerichtete Wirkstoffabgabe. Dazu werden Nukleinsäuren, z. B. DNA- oder RNA-Sequenzen, die Gene oder Genfragmente enthalten und in linearer Form oder in Form von circular geschlossen Vektoren, die weiteres genetisches Material enthalten können, vorliegen, oder aber pharmazeutische oder kosmetische Wirkstoffe in reine TEL-Liposomen oder Mischliposomen, reine Lipidagglomerate und Mischagglomerate verpackt und den Zielzellen in vitro oder in vivo zugesetzt. Wenn die Liposomenmembran bzw. Agglomeratoberfläche darüber hinaus z. B. Antikörper enthält, für die entsprechende Proteine auf den mit der Therapie zu erreichenden Zellen vorhanden sind, so wird durch den Kontakt zwischen Antigen auf der Zielzelle und Antikörper in der Membran des erfindungsgemäßen Liposoms bzw. Agglomeratoberfläche ein Kontakt zwischen Liposom- bzw. Agglomeratoberfläche und Zielzelle gefördert. Gleiches gilt für die anderen zuvor erwähnten Liganden, die mit Substanzen auf der Zielzelloberfläche reagieren können.

[0065] Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung enthält die zuvor beschriebenen Liposomen oder Lipidagglomerate sowie ein physiologisch verträgliches Verdünnungsmittel.

[0066] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein in vitro-Transfektionskit bereit, das die erfindungsgemäßen Liposomen und/oder Lipidagglomerate sowie geeignete Puffer enthält.

[0067] Die erfindungsgemäßen Liposomen oder Lipidagglomerate können zum Herstellen eines Medikamentes für die Gentherapie an Säugern verwendet werden.

[0068] Die erfindungsgemäßen Liposomen oder Lipidagglomerate können ebenfalls zur Transfektion eukaryontischer Zellen in vitro verwendet werden.

[0069] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen oder Lipidagglomerate zum Verpacken von Wirkstoffen für die orale, enterale, parenterale, intravenöse, intramuskuläre, intraartikuläre, topische, subkutane, pulmonale oder intraperitoneale Applikation.

[0070] In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform dienen die erfindungsgemäßen TEL-Derivate in reiner Form oder als Bestandteil von reinen oder gemischten Liposomen oder Lipidagglomeraten als Grundlage für die Herstellung medizinischer Salben oder Hautcremes.

[0071] Die erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate und Zusammensetzungen können zum Beschichten von Oberflächen, insbesondere von Metall- oder Kunststoffoberflächen, verwendet werden.

[0072] Tetraetherlipide lassen sich als monomolekulare Schicht kovalent an Oberflächen (z. B. Stents, Implantate) koppeln. Beispiele für solche Verfahren werden in der WO-A-97/31927 beschrieben. In der monomolekularen Schicht können hydrophobe Wirkstoffe wie in eine Membran eingeschlossen werden. Weiterhin lassen sich Wirkstoffe an die hydrophilen Kopfgruppen koppeln. Die nach diesen Möglichkeiten mit Wirkstoffen beladenen Oberflächen gestatten die langsame und kontinuierliche Wirkstoff-Freisetzung über längere Zeiträume. Hierdurch läßt sich beispielsweise die Verträglichkeit von beschichteten Stents oder Implantaten erhöhen.

[0073] Beispiele für zu beschichtende Oberflächen umfassen oxidische Oberflächen (z. B. Oxidschichten auf Titan), Keramikoberflächen, Halbleiteroberflächen, Glasoberflächen, Glaskohlenstoffoberflächen, Cellulosefolien (die Kopplung erfolgt über Cyanurchlorid-Aktivierung und -Kopplung), Goldoberflächen (die Kopplung erfolgt über SH-Gruppen (entweder elektrochemisch oder z. B. über Iminothiolan (Mitsunobu-Reaktion)) sowie Polymeroberflächen, wie z. B. Polyurethanoberflächen, Teflonoberflächen, Polystyroloberflächen, Polyacrylharzoberflächen (Kopplung je nach reaktiven Gruppen auf der Polymeroberfläche).

[0074] Die folgenden Abbildungen und Beispiele erläutern die Erfindung.

60 Beschreibung der Abbildungen

[0075] Die Abb. 1 bis 3 zeigen das Massenspektrum (MALDI-TOF), das ¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, 270 MHz) und das ¹³C-NMR-Spektrum (CDCl₃, 68 MHz) der Verbindung II.

[0076] Die Abb. 4 und 5 zeigen das Massenspektrum (ESI) und das IR-Spektrum (NaCl) von Verbindung IV.

[0077] Die Abb. 6 und 7 zeigen das Massenspektrum (ESI) und das IR-Spektrum (NaCl) der Verbindung V.

[0078] Abb. 8 zeigt die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung für Liposomen, enthaltend Verbindung V.

[0079] Die Abb. 9 und 10 zeigen das ¹H-NMR-Spektrum und das Massenspektrum (FD) des di-BOC-TREN.

[0080] Abb. 11 zeigt das Massenspektrum der Boc-geschützten Verbindung IX.

- [0081] Die Abb. 12 und 13 zeigen das Massenspektrum (DEI) und das IR-Spektrum (NaCl) der Verbindung XI.
 [0082] Abb. 14 zeigt die Transfektion von CHO-Zellen mit Liposomen, enthaltend Verbindung XI.
 [0083] Abb. 15 zeigt das Massenspektrum (FD) der Boc-geschützten Verbindung XII.

Beispiel 1

5

Fermentation von *Sulfolobus acidocaldarius*

- [0084] Bei der Fermentation von *Sulfolobus acidocaldarius* geht man folgendermaßen vor:
 [0085] Zur Kultivierung der Vorkultur wird diese mit einem Aliquot aus einer Glycerinkultur, die bei -80°C gelagert wird, angeimpft. Diese Vorkultur wird dann bei 125 Umdrehungen/Minute, 78°C , $\text{pH} = 3,3$ für ca. 50 Stunden im Schüttelbad geschüttelt.
 [0086] Mit dieser Vorkultur wird nun der Fermenter angeimpft, der steriles Medium enthält. Im Fermenter wird ein Sauerstoffpartialdruck von 20% eingestellt, der während der ganzen Fermentation konstant gehalten wird. Die Temperatur und der pH-Wert entsprechen den Werten der Vorkultur und bleiben ebenfalls während der Fermentation konstant.
 [0087] Nach 24 Stunden Fermentationszeit bei diesen Bedingungen beginnt eine kontinuierliche Zudosierung von Nährstoffen (Hefeextrakt und Proteinhydrolysat) bis zum Ende der Fermentation. Diese Zufütterung sorgt für eine konstant optimale Versorgung der Bakterien mit Nährstoffen. Das bewirkt schnelleres Wachstum und eine hohe Biomasseausbeute. Die Fermentation ist nach ca. 50 bis 60 Stunden beendet.
 [0088] Das Medium wird nach Beendigung der Fermentation auf Raumtemperatur abgekühlt und die Biomasse durch einen Separator vom übrigen Medium abgetrennt. Diese Biofeuchtmasse wird anschließend mittels Gefriertrocknung weitgehend wasserfrei gemacht. Das daraus erhaltene Lyophilisat ist nun Ausgangspunkt für die darauf folgenden Aufarbeitungsschritte zur Isolierung der Tetraetherlipide.

Beispiel 2

25

Gewinnung von Tetraetherlipiden aus *Sulfolobus acidocaldarius*1) Extraktion der Lipide aus *Sulfolobus acidocaldarius*

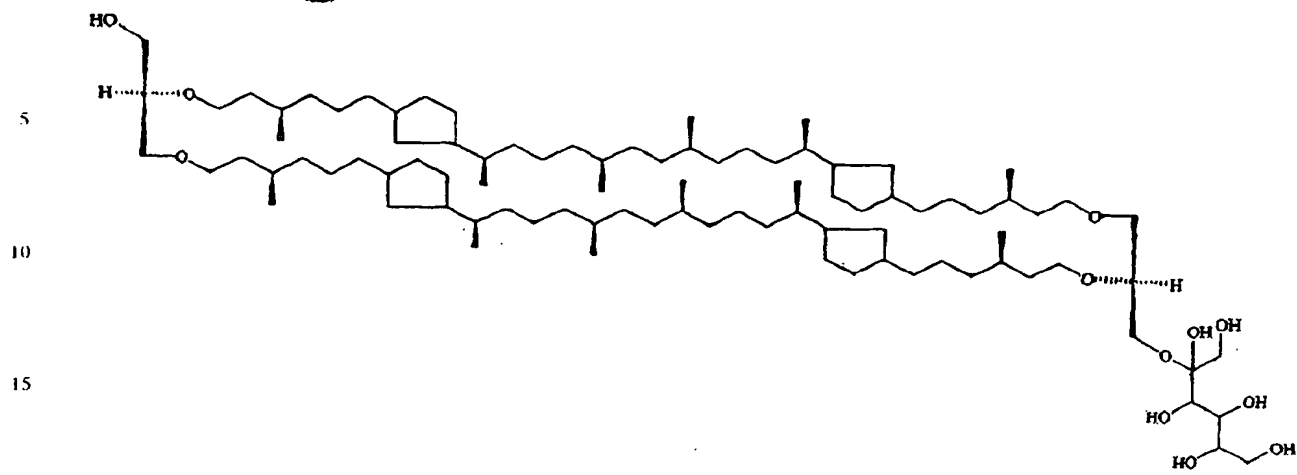
- [0089] 53,2 g Lyophilisat wurden in 3 Ansätzen zu je ca. 18 g extrahiert.
 [0090] Die gefriergetrocknete Zellmasse wurde fein gemörsert, in eine Extraktionshülse gefüllt und mit Glaswolle abgedeckt. Die Extraktion erfolgte in einer 150 ml-Soxhlett-Apparatur mit 300 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1 : 1) (500 ml-Kolben) unter N_2 -Ballon. Aus der bräunlich klaren Extraktionslösung fiel ein Teil der Lipide aus. Einmal täglich wurde die Lösungsmittelmenge kontrolliert und bei Bedarf nachgefüllt (ca. 50 ml alle 2 Tage). Nach 100 bis 120 h wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und die extrahierte Menge bestimmt (3,14 g, 5,9%).

2) Hydrolyse der Lipide aus *Sulfolobus acidocaldarius*:

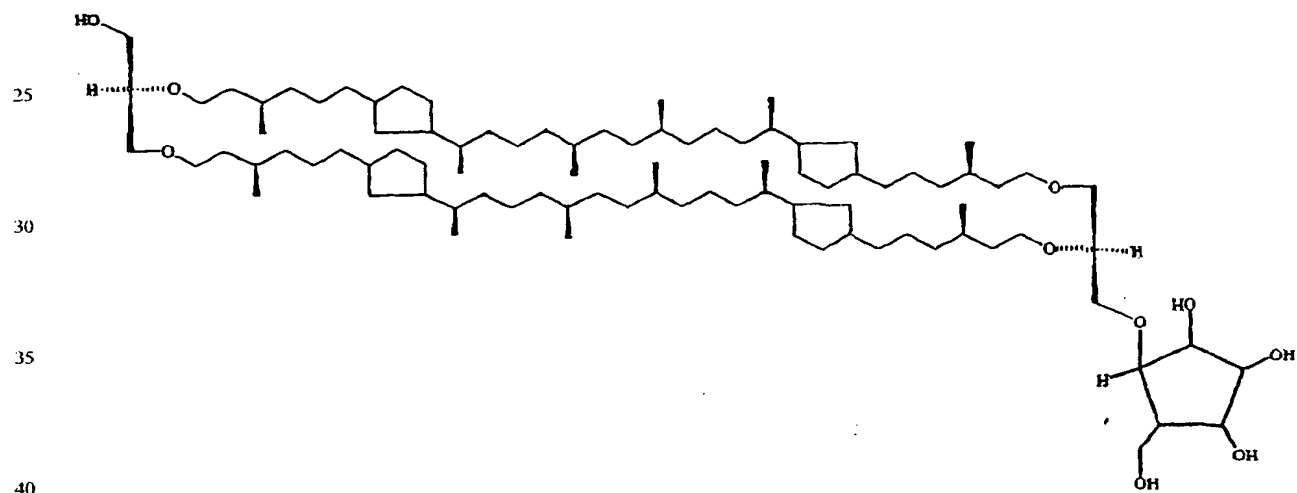
- [0091] 3,14 g Lipid-Rohextrakt wurden – mit 350 ml Methanol/37% HCl (4 : 1) versetzt und anschließend 48 h unter Rückfluß erhitzt. Danach wurden 35 ml 37% HCl zugegeben und weitere 60 h erhitzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 150 ml CHCl_3 extrahiert und die salzsaure Phase noch zweimal mit je 100 ml CHCl_3 . Die vereinten organischen Phasen wurden benutzt, um den abfiltrierten Niederschlag zu lösen. Nach Abtrennung von restlichem Wasser wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Es wurden 1,90 g (60%) Hydrolysat erhalten.

GCTE: Glycerol-dialkyl-calditol-tetraether

- [0092] Ca. 55,3% der Chloroform-löslichen Anteile des hydrolysierten Gesamtlipidextrakts werden mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ = 95 : 5 eluiert.



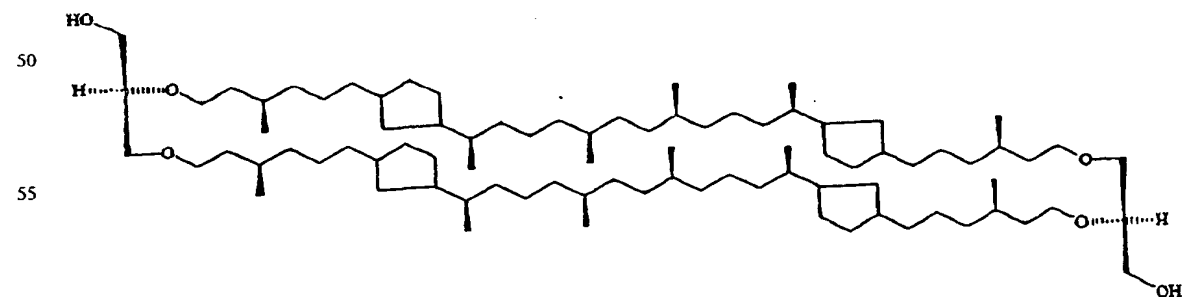
20 und/oder



[0093] Beide Verbindungen können als Gemisch vorliegen.

DGTE: Glycerol-dialkyl-glycerol-tetraether

[0094] Ca. 17,1% der Chloroform-löslichen Anteile des hydrolysierten Gesamtlipidextrakts werden mit $\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O} = 9 : 1$ eluiert.



[0095] Durch Glycolspaltung kann der GCTE entsprechend der ersten Strukturformel in den DGTE umgewandelt werden.

Dünnschicht-Chromatographie (Kieselgel Si 60)

$\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O} = 9 : 4$
 DGTE $R_f = 0,17$
 GCTE $R_f = 0,00$

CHCl₃/MeOH = 9 : 5DGTE R_f = 0,80GCTE R_f = 0,19

3) Säulenchromatographie

Aufbau der Säule

80 × 4 cm:

0,5 cm Seesand

61 cm Si 60 (Ø 0,063–0,200), 400 g (770 ml)

1 cm Celite

1 cm Seesand

Glaswolle oder Fritte

[0096] Das Kieselgel wurde gequollen in CHCl₃/Et₂O (9 : 1).[0097] 3,0 g Hydrolysat wurden in 10 ml CHCl₃/Et₂O (9 : 1) gelöst und aufgetragen. 20 ml Laufmittel wurde zum Nachspülen verwendet. Dann wurde mit CHCl₃/Et₂O (9 : 1) chromatographiert.

Verlauf der Chromatographie

R _f CHCl ₃ /Et ₂ O 9/1	R _f CHCl ₃ /MeOH 9/1	Laufmittel- verbrauch	Menge	Anmerkung
um 0,9	um 0,9	400-500 ml C/E (9:1)	ca. 100 mg	orangefarbener Ring: mehrere orange Bakteri- enfarbstoffe, die in 3 Frak- tionen aufgefangen wur- den.
0,6 und 0,4			je < 10 mg	wahrscheinlich offenkettige Lipide
0,2	0,7	2000-2400 ml C/E (9:1)	200-300 mg	brauner Ring: 6,7-10% DGTE

Umstellung des Laufmittels auf CHCl₃/MeOH (9 : 1)

< 0,1	0,6-0,3	1400-1700 ml C/M (9:1)	0-300 mg	hellbrauner Ring: Produkte unvollständiger Hydrolyse, die hauptsäch- lich GCTE und fast gar kein DGTE enthalten
≈ 0	0,2	1750-2000 ml C/M (9:1), 2000-4070 ml C/M (4:1)	1200-1300 mg	brauner Ring: ca. 40% GCTE

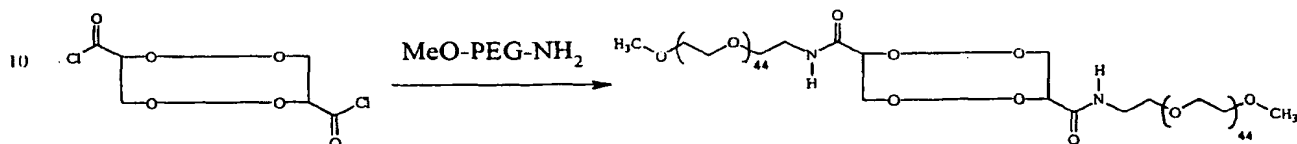
[0098] Die in den folgenden Beispielen verwendeten Ausgangsverbindungen können aus den gewonnenen Tetraetherlipiden unter Anwendung bekannter Verfahren erhalten werden. Solche Verfahren werden z. B. in der WO-A-97/31927

und in der DE-A-197 36 592 beschrieben.

Beispiel 3

Herstellung von Tetraetherlipidderivaten

3.1 Synthese von Bis-(Methoxy-PEG)-Tetraether (II)



DGTE

Bis-(Methoxy-PEG)-Tetraether

[0099] Ca. 9,6 mg (7,1 μmol) DGTE-Disäurechlorid werden unter Rühren und Stickstoff mit einer Lösung von 34,1 mg (17,1 μmol) MeO-PEG-NH₂ (MG = 2000) in 1,10 ml Dichlormethan versetzt. Sofort danach werden 50 μl (36,3 mg, 358,7 μmol) Triethylamin zugegeben und 24 h gerührt. Alles Flüchtige wird in eine Kühltalle (flüssiger Stickstoff) kondensiert. Der Rückstand wird auf Kieselgel 60 (0,040–0,063 mm, 13 g, Laufmittel: Chloroform/Methanol = 80 : 20) chromatographiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und auf Kieselgel 60 (0,040–0,063 mm, 39 g, Laufmittel: Chloroform/Methanol = 95 : 5) rechromatographiert. Man erhält 26,6 mg (5,01 μmol , 71%) des zweifach pegylierten Tetraethers.

Analytik

Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60)

Laufmittel: Chloroform/Methanol = 80 : 20; R_f = 0,83

Anfärbung: Schwefelsäure-Reagenz (braun-schwarzer Fleck)

¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie

[0100] Die Integration der Ether-Protonen gegen die Alkyl-Protonen im ¹H-NMR-Spektrum (270 MHz) zeigt, daß zwei PEG-Ketten pro Tetraether-Makrocyclus gebunden sind:

theoretisches Verhältnis = 363/144 = 2,52

experimentell bestimmtes Verhältnis = 2,56

ausgewählte ¹³C-NMR-Daten:

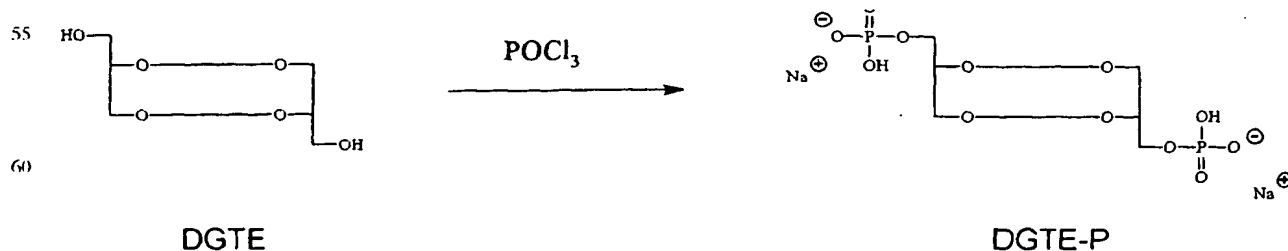
$\delta^{13}\text{C}$ (67,9 MHz, CDCl₃) = 170,7 (-CONH-), 70,6 (-O-CH₂-PEG), 72,0, 70,4, 70,0, 69,9, 69,7 (weitere Ether-C), 59,1 (-CONH-CH₂-).

Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

[0101] Das Massenspektrum zeigt einen Satz von äquidistanten Linien mit einem Abstand von 44 Masseneinheiten (Ethylenoxid-Einheit). Die Verteilung der Höhen dieser Linien entspricht einer Gauss-Verteilung. Das Zentrum liegt ca. bei m/z = 5335. Die Grenzen liegen bei m/z = 4586 und 6215. Die Linien lassen sich als Addukte des zweifach pegylierten Tetraethers (4 Pentacyklen pro Tetraether-Makrocyclus) mit Natrium erklären. Aus dem Zentrum bei m/z = 5335 ergibt sich, daß die PEG-Ketten im Mittel aus 44 Ethylenoxid-Einheiten (n = 44) bestehen. Die mittlere Molmasse für die Verbindung beträgt somit MG = 5313,0 g/mol.

[0102] Das Massenspektrum (MALDI-TOF), das ¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, 270 MHz) und das ¹³C-NMR-Spektrum (CDCl₃, 68 MHz) der Verbindung II sind in den Abb. 1 bis 3 gezeigt.

3.2 Synthese von DGTE-P (IV)



DGTE

DGTE-P

[0103] 102 mg (78,7 μmol) DGTE werden in 700 μl wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und unter Schutzgas mit 36,3 μl (450 μmol) wasserfreiem Pyridin versetzt. Bei 0°C werden über eine Spritze tropfenweise (innerhalb 5 min) 16,5 μl (180 μmol) Phosphorylchlorid in 200 μl Tetrahydrofuran zugegeben. Der Ansatz wird 3 h bei 0°C gerührt, mit 800 μl einer 10% Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und weitere 15 min gerührt. Unter Eiskühlung wird der An-

saft mit 10% Salzsäure auf pH = 0 gebracht. Die wäßrige Phase wird 10 mal mit Chloroform/Methanol (2 : 1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt (Rohausbeute: 98,7 mg). Der Rückstand wird zweimal über Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (15 g Kieselgel 60 (0,040–0,063 mm; Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser/37% NH₃ (60 : 34 : 5, 5 : 0,5)). Das Produkt wird in CHCl₃/MeOH (2 : 1) und 14%iger Salzsäure in Wasser aufgenommen und fünfmal mit Chloroform/Methanol (2 : 1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der feste, leicht gelbliche Rückstand wird aus Chloroform und Chloroform/Methanol (2 : 1) umkristallisiert. Es werden 23 mg (20%) DGTE-P als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

Analytik

Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60)

Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser/37% NH₃ = 60 : 34 : 5, 5 : 0,5; R_f = 0,07.

Anfärbung: Schwefelsäure-Reagenz (braun-schwarzer Fleck)

Massenspektrometrie (ESI)

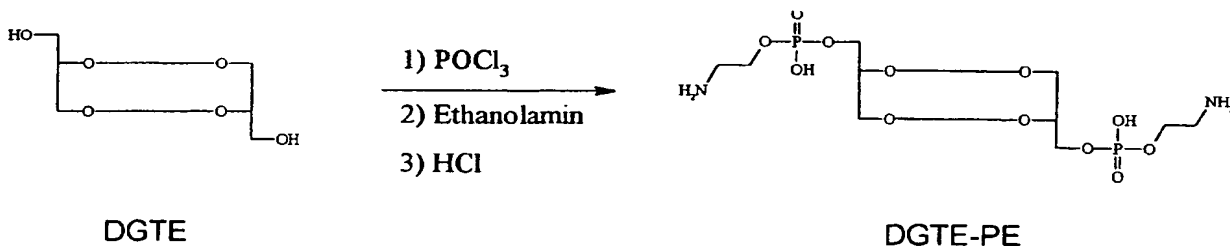
m/z: 1452,2 (53) [M⁺ – 1], 725,8 (100) [M²⁺ – 1]

IR-Spektroskopie (NaCl)

ν = 2923 cm⁻¹ (Alkyl), 2855 (Alkyl), 1462 (Alkyl), 1377 (Alkyl), 1115 (Ether), 1061 (P-O-C)

[0104] Das Massenspektrum (ESI) und das IR-Spektrum (NaCl) von Verbindung IV sind in den Abb. 4 und 5 gezeigt.

3.3 Synthese von DGTE-PE (V)



[0105] 150 µl wasserfreies Tetrahydrofuran wird unter Stickstoffatmosphäre vorgelegt. Bei 0 bis 5°C (Eisbad) werden langsam über eine Spritze 6,20 µl (68,2 µmol) Phosphorylchlorid und anschließend 10,4 µl (74,9 µmol) Triethylamin zugegeben. Unter gutem Rühren werden bei 0°C 44,3 mg (34,0 µmol) wasserfreies DGTE langsam innerhalb 15 min zugegeben. Nach 1 h Rühren wird das Reaktionsgemisch mit einer Lösung aus 4,50 µl (74,9 µmol) wasserfreiem Ethanolamin, 37,7 µl (270 µmol) Triethylamin und 88,6 µl wasserfreiem Tetrahydrofuran versetzt. Das Gemisch wird 1 h bei 0–5°C gerührt und danach mit 1 M Salzsäure angesäuert (pH = 2), woraufhin ein farbloser Niederschlag entsteht. Die wäßrige Phase wird 10 mal mit Chloroform/Methanol (2 : 1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (15 g Kieselgel (0,04–0,063 mm). Als Laufmittel wird Chloroform/Methanol (3 : 1) und anschließend, nachdem der DGTE vollständig eluiert ist, Chloroform/Methanol/Wasser/37% NH₃ (60 : 34 : 5, 5 : 0,5) verwendet. Es werden ca. 11 mg (20%) DGTE-PE als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten, der aus CHCl₃/MeOH (2 : 1) umkristallisiert werden kann.

Analytik

Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60)

Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser/37% NH₃ = 60 : 34 : 5, 5 : 0,5; R_f (DGTE-PE) = 0,23.

Laufmittel: Chloroform/Methanol = 3 : 1; R_f (DGTE) = 0,95, R_f (DGTE-PE) = 0,0.

Anfärbung: Schwefelsäure-Reagenz (braun-schwarzer Fleck).

Massenspektrometrie (ESI)

m/z: 1540,4 (64) [M⁺ – 1], 770,8 (100) [M²⁺ – 1].

IR-Spektroskopie (NaCl)

ν = 3139 cm⁻¹ (Ammonium), 3047 (Ammonium), 2921 (Alkyl), 2852 (Alkyl), 1446 (Alkyl), 1406 (Alkyl), 1378 (Alkyl), 1215 (P=O), 1074 (P-O-C).

[0106] Das Massenspektrum (ESI) und das IR-Spektrum (NaCl) der Verbindung V sind in den Abb. 6 und 7 gezeigt.

Liposomen, bestehend aus Verbindung V und Phosphatidylcholin

1. Liposomen-Präparation durch Detergenz-Dialyse

[0107] Die Verbindung V und das Lipid Phosphatidylcholin (aus Eiweiß) werden in verschiedenen Verhältnissen (s. 1.2.) gemischt und in 1 ml einer Mischung aus Chloroform und Methanol, 2 : 1 gelöst. Der Gesamtlipidgehalt der Ansätze beträgt jeweils 120 nmol. Nach Zugabe von 480 nmol Natrium-Cholat als Detergenz wird die Mischung am Rotationsverdampfer eingedampft, in 1 ml Ethanol aufgenommen, erneut eingedampft und 30 min bei 50°C und 20 mbar getrocknet. Das System Verbindung V/Phosphatidylcholin bildet in allen untersuchten Mischungsverhältnissen einen homogenen, transparenten Film. Der Lipid-Detergenz-Film wird in 400 µl Dialyse-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl) aufgenommen, in eine Dialyse-Kapsel (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) überführt und mit einer Dialysemembran versehen (Ausschlußgrenze 10 kDa, Dianorm GmbH, München). Die Lipid-Detergenz-Mischung wird 36 h gegen das 1000-fache Volumen an Dialyse-Puffer dialysiert. In dieser Zeit wird der Dialyse-Puffer dreimal ausgetauscht.

2. Charakterisierung der Liposomen

[0108] Die Zusammensetzung der Liposomen wird mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie untersucht. Zur Extraktion werden jeweils 20 µl der Liposomen-Lösung mit 80 µl Chloroform : Methanol, 2 : 1 versetzt, 5 min geschüttelt und 5 min bei 14000 g zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wird abgenommen und verworfen. Die organische Phase wird unter Stickstoff verdampft, in 20 µl Chloroform : Methanol, 2 : 1 aufgenommen und auf eine HPTLC-Dünnschichtplatte (Merck, Darmstadt, Germany) aufgetragen. Nach Entwicklung der HPTLC im Laufmittel Chloroform : Methanol : Wasser : Ammoniaklg. (32%) 60 : 34 : 5 : 5 wird die Platte kurz in die Färbelösung (3% (w/v) Kupferacetat in 8% (v/v) Phosphorsäure) getaucht und 20 min bei 180°C erhitzt. Die Identifizierung der Lipide erfolgt über den Vergleich mit Lipid-Standards.

[0109] Die Partikelgrößenbestimmung erfolgt durch dynamische Lichtstreuung mit einem Particle-Sizing-System (380 ZLS, Nicomp Inc., Santa Barbara, CA, U.S.A.) in einem Probenvolumen von 150 µl. Die Partikelgröße wird Intensitäts-gewichtet auf Basis einer Gaußverteilung angegeben.

3. Ergebnisse

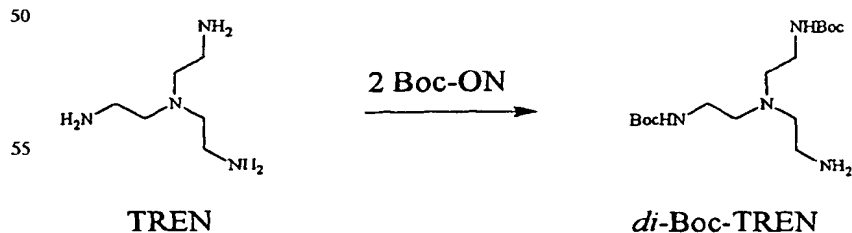
[0110] Nach dem in 1.1. beschriebenen Verfahren wurden 4 Liposomen-Ansätze mit folgenden Gehalten an Verbindung V hergestellt: 20 mol%, 33 mol%, 50 mol%, 100 mol%. Da die Verbindung V die Membran ganz durchspannt, Phosphatidylcholin jedoch nur halb, haben die Halbseiten der Lipiddoppelschicht die folgende Zusammensetzung: 33 mol%, 50 mol%, 66 mol% und 100 mol% Verbindung V.

[0111] In allen Fällen ergab die Detergenz-Dialyse klare Lösungen ohne erkennbare Bildung von Aggregaten. Die Zusammensetzung der Liposomen wurde durch Dünnschichtchromatographie überprüft und entsprach der Zusammensetzung, in der die beiden Lipide eingesetzt wurden, was darauf hindeutet, dass es während der Herstellung keine Verluste an einer der Komponenten gab. Die Größe der Liposomen war abhängig von der Lipid-Zusammensetzung und stieg nahezu linear mit dem an Gehalt an Verbindung V (in mol%) an. In Abb. 8 sind die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung dargestellt.

[0112] Die Ergebnisse zeigen, dass sich aus der Verbindung V und dem Phosphatidylcholin in einem weiten Konzentrationsbereich (bis zu 100% Verbindung V) Misch-Liposomen herstellen lassen.

Beispiel 5

Synthese von di-BOC-TREN



[0113] 1,40 ml (9,35 mmol) TREN [Tris-(2-aminoethyl)-amin] und 3,91 ml (28,1 mmol) Triethylamin werden unter Stickstoffatmosphäre in 40 ml wasserfreiem THF gelöst. 4,61 g (18,7 mmol) BOC-ON werden ebenfalls in 10 ml wasserfreiem THF gelöst und über ein Septum und unter Wasserkühlung zu der Lösung gespritzt. Die Reaktionsmischung wird 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird verdampft und das verbleibende gelbe Öl auf Kieselgel chromatographiert (ca. 130 g Kieselgel 60, 0,063-0,200 mm, Laufmittel: Essigester/Methanol = 3 : 2 (0,5% Eisessig)). Das Lösungsmittel der aufgefundenen Fraktionen wird verdampft und der Rückstand in Essigsäure gelöst. Dann wird durch Ausschütteln mit 1 M Natronlauge entsäuert. Nach Waschen mit Wasser und Trocknen über Natriumsulfat werden 561 mg (17%) di-BOC-TREN als gelbes Öl erhalten.

Laufmittel: Essigester; $R_f = 0,12$.

Anfärbung: Ninhydrin-Lösung (roter Fleck)

Massenspektrometrie (FD^+)

m/z : 347,7 [$M^+ + 1$]

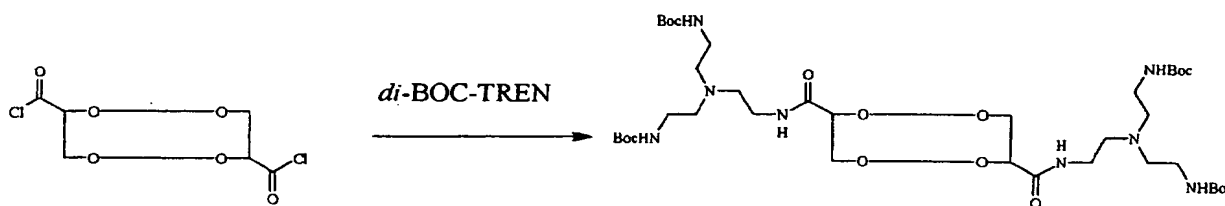
1H NMR-Spektroskopie (270 MHz, $CDCl_3$)

$\delta = 1,43$ (s, 18H, $2 \times tBu$), 2,45–3,25 (m, 12H, CH_2)

[0114] Das 1H -NMR-Spektrum und das Massenspektrum (FD) des di-BOC-TREN sind in den Abb. 9 und 10 gezeigt.

Beispiel 6

6.1 Synthese von BOC-AF4 (BOC-geschütztes IX)



DGTE-Disäurechlorid

BOC-AF4

[0115] Zu ca. 11,1 mg (8,17 μ mol) DGTE-Disäurechlorid werden unter Stickstoff 1,0 ml CH_2Cl_2 durch ein Septum gespritzt. Sobald das Säurechlorid gelöst ist, werden unter Rühren und Eiskühlung nacheinander 11 μ l (78 μ mol) Triethylamin und 29,7 mg (85,7 μ mol) di-BOC-TREN, gelöst in 0,3 ml CH_2Cl_2 , zugegeben. Nach 1 h wird die Kühlung entfernt und weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird verdampft und der Rückstand mit Essigester auf Kieselgel chromatographiert (ca. 5 g Kieselgel 60, 0,040–0,063 mm). Dabei werden nach Trocknen über Natriumsulfat 6,0 mg (37%) BOC-AF4 erhalten.

Analytik

Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60)

Laufmittel: Essigester; $R_f = 0,27$.

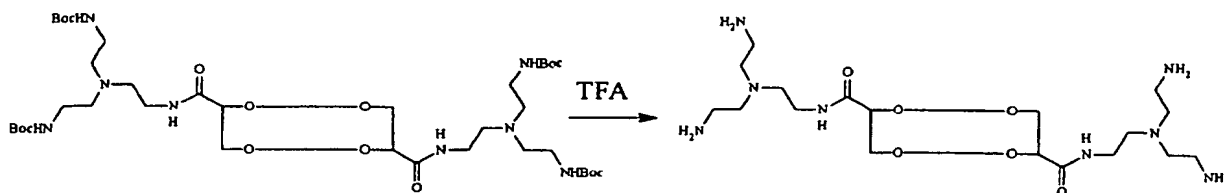
Anfärbung: Schwefelsäure-Reagenz (braun-schwarzer Fleck)

Massenspektrometrie (FD^+)

m/z : 1979 [M^+]

[0116] Das Massenspektrum der Boc-geschützten Verbindung IX ist in Abb. 11 gezeigt.

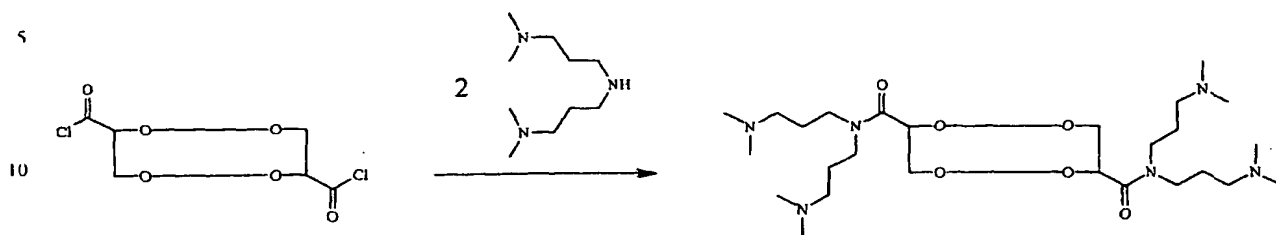
6.2 Synthese von AF4 (IX)



[0117] Das BOC-AF7 wird in $CHCl_3$ gelöst und zur Abspaltung der BOC-Schutzgruppen 15 min mit Trifluoressigsäure (TFA) gerührt.

Beispiel 7

Synthese von AF6 (XI)



DGTE-Disäurechlorid

AF6

[0118] Zu 21 mg (16 μmol) DGTE-Disäurechlorid werden unter Stickstoff 2,0 ml CH_2Cl_2 durch ein Septum gespritzt. Sobald das Säurechlorid gelöst ist, werden unter Rühren und Eiskühlung 180 μl (800 μmol) Bis-[3-(dimethylamino)-propyl]-amin zugegeben. Nach 30 min wird die Kühlung entfernt und weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die hellgelbe Lösung wird mit 10 ml CHCl_3 /Methanol (4 : 1) versetzt und mit 10 ml Wasser gewaschen. Dann wird das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand auf Kieselgel chromatographiert (ca. 5 g Kieselgel 60, 0,040–0,063 mm). Als Laufmittel wird CHCl_3 /Methanol/Essigsäure/Wasser (9 : 4 : 1 : 1) verwendet. Die Chromatographie ergibt ca. 16 mg (60%) AF6.

Analytik

Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60)

Laufmittel: CHCl_3 /Methanol/Essigsäure/Wasser = 9 : 4 : 1 : 1; R_f = 0,1.
Anfärbung: Schwefelsäure-Reagenz (braun-schwarzer Fleck)

Massenspektrometrie (DEI)

$M^+ = 1661$

IR-Spektroskopie

[0119] $\nu = 1649 \text{ cm}^{-1}$ (Amid I), 1461 und 1377 (typisch für das Tetraethergerüst)

[0120] Das Massenspektrum (DEI) und das IR-Spektrum (NaCl) der Verbindung XI sind in den Abb. 12 und 13 gezeigt.

Beispiel 8

Liposomen, enthaltend Verbindung XI als Transfektionsmittel

1. Liposomen-Präparation durch Detergenz-Dialyse

[0121] Die Präparation der Liposomen erfolgt durch Detergenz-Dialyse analog zum oben für Verbindung 5 beschriebenen Verfahren. Neben der Verbindung XI werden die Lipide Phosphatidylcholin (aus Eiweiß), Cholesterin (aus Wollfett) und Diolethylphosphatidylethanolamin (synthetisch) in verschiedenen Verhältnissen eingesetzt. Die Lipide werden in Konzentrationen von maximal 1 mM Gesamtlipid mit der zehnfachen molaren Menge an Natrium-Cholat umgesetzt.

2. Transfektion von tierischen Zellen mit Liposomen, enthaltend die Verbindung XI

[0122] Chinese Hamster Ovary Cells (CHO-Zellen) werden 24 h vor der Transfektion mit einer Dichte von $3 \times 10^5 \times \text{cm}^{-2}$ in 48-weil-Zellkulturplatten ausgesät. Die Kultivierung erfolgt in Iscoves Modified Dulbeccos Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin (37°C, 5% CO_2 , 70% Luftfeuchtigkeit). Liposomen, enthaltend Verbindung XI werden in verschiedenen Mengen von 0,25–6,0 nmol Verbindung XI vorgelegt und mit 1 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl auf ein Volumen von 60 μl aufgefüllt. Die Ansätze werden mit 70 μl Opti-MEM (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jedem Ansatz werden 0,15 μg Plasmid-DNA in 70 μl Opti-MEM gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die CHO-Zellen werden zweimal mit Phosphat-gepufferter Saline gewaschen, mit 150 μl des Transfektions-Ansatzes versetzt und 5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Transfektionslösung abgenommen, durch 400 μl Kulturmedium ersetzt und weitere 24 h inkubiert.

[0123] Es werden zwei unterschiedliche Plasmide eingesetzt, die für die Reportergene β -Galactosidase bzw. das green fluorescent protein (GFP) codieren (pCMVB bzw. pEGFP-N2; Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wird die in den Zellen exprimierte β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Dazu werden die Zellen in den 48-weil-Platten dreimal mit Phosphat-gepufferter Saline gewaschen, mit 150 μl bidest. Wasser versetzt, bei –70°C eingefroren und wieder aufgetaut und anschließend 30 min bei 3000 g zentrifugiert. Von dem im Überstand befindlichen

Zell-Lysat werden 10 µl der β -Galactosidase-Bestimmung zugeführt (Groth et. al. (1998), Anal. Biochem. 258: 141–143). Die Bestimmung des Zell-Proteins erfolgt nach der Bichinin-Methode an 20 µl des Zell-Lysates mit Serum-Albumin als Standard (Smith et al. (1985), Anal. Biochem. 150: 76–85). Die spezifische β -Galactosidase-Aktivität wird in mU/mg Zellprotein angegeben.

[0124] Transfektionen mit dem green fluorescent protein werden fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Zeiss Axiovert 25 Mikroskop mit Fluoreszenz-Anregung: Filter LP 515, Strahlteiler FT 510, Carl Zeiss, Jena, Germany; Digitale Mikroskop-Camera: DMC 1e, Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA)

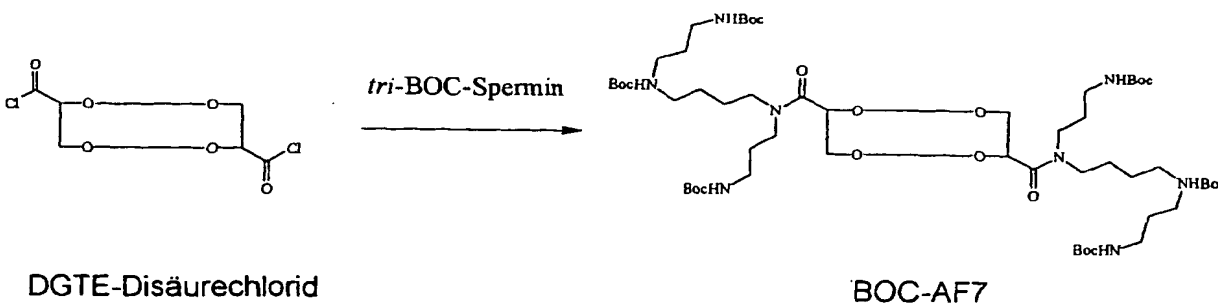
3. Ergebnisse

[0125] Aus der Verbindung XI lassen sich mit den drei Co-Lipiden Phosphatidylcholin (PC), Cholesterin (Chol) und Diolethylphosphatidylethanolamin (PE) in unterschiedlichen Verhältnissen Liposomen herstellen. Darstellbar sind Liposomen der Zusammensetzung XI : PC : PE : Chol = 1 : A : B : C mit A, B, C zwischen 0,5 und 2. Alle Liposomen zeigen mehr oder minder starke Transfektionseigenschaften. Exemplarisch sollen Liposomen der Zusammensetzung XI : PC : PE : Chol = 1 : 1 : 1 : 1 (Mol%) vorgestellt werden. Die Transfektionseffizienz zeigt eine starke Abhängigkeit vom Verhältnis der Verbindung XI zum DNA-Gehalt des Transfektions-Ansatzes mit einem Optimum bei 3 nmol XI/µg DNA. In Gegenwart von 5% fötalem Kälberserum im Transfektions-Ansatz geht die Transfektionseffizienz im Maximum um ca. 30% zurück und das optimale Lipid-DNA-Verhältnis verschiebt sich zu 7,5 nmol XI/µg DNA. Die Transfektionsversuche mit dem green fluorescent protein zeigen, daß ca. 10% der CHO-Zellen transfiziert sind.

[0126] Abb. 14 zeigt das Ergebnis einer Transfektion von CHO-Zellen mit Liposomen, enthaltend Verbindung XI. Links ist ein Transfektionseffizienz in Abhängigkeit vom Verhältnis der Verbindung XI zum DNA-Gehalt (in nmol XI/µg DNA) gezeigt; dargestellt ist die spezifische β -Galactosidase-Aktivität der Transfektionsansätze unter serumfreien Bedingungen (Rauten) und in Gegenwart von 5% fötalem Kälberserum. Rechts ist die Transfektion von CHO-Zellen mit dem green fluorescent protein dargestellt; oben als fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, unten als phasenkontrastmikroskopische Aufnahme.

Beispiel 9

9.1 Synthese von BOC-AF7 (BOC-geschütztes XII)



[0127] Zu ca. 10,6 mg (7,79 µmol) DGTE-Disäurechlorid werden unter Stickstoff 1,0 ml CH_2Cl_2 durch ein Septum gespritzt. Sobald das Säurechlorid gelöst ist, werden unter Rühren und Eiskühlung nacheinander 11 µl (78 µmol) Triethylamin und 39,1 mg (77,8 µmol) tri-BOC-Spermin, gelöst in 0,2 ml CH_2Cl_2 , zugegeben. Nach 30 min wird die Kühlung entfernt und weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird verdampft und der Rückstand in Hexan/Essigester (1 : 1) gelöst. Das Rohprodukt wird durch zweimaliges Chromatographieren auf Kieselgel gereinigt (beide Säulen je ca. 5 g Kieselgel 60, 0,040–0,063 mm). Bei der ersten Chromatographie wird Hexan/Essigester (1 : 1) als Laufmittel verwendet, die zweite wird mit reinem Essigester durchgeführt. Die Chromatographie ergibt 4,2 mg (24%) BOC-AF7.

Analytik

Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60)

Laufmittel: Hexan/Essigester = 3 : 4; R_f = 0,2.

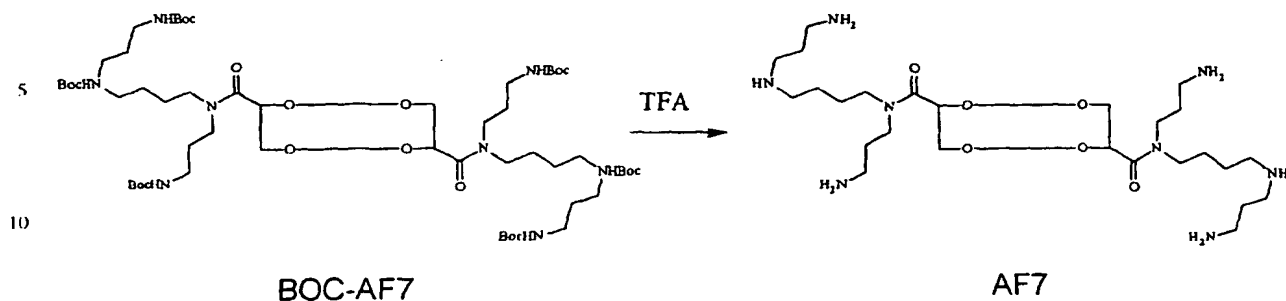
Essigester; R_f = 0,7.

Anfärbung: Schwefelsäure-Reagenz (braun-schwarzer Fleck)

Massenspektrometrie (FD⁺)

m/z: 2291,5 [M^+], 501,7 [(tri-BOC-Spermin⁺-1)]

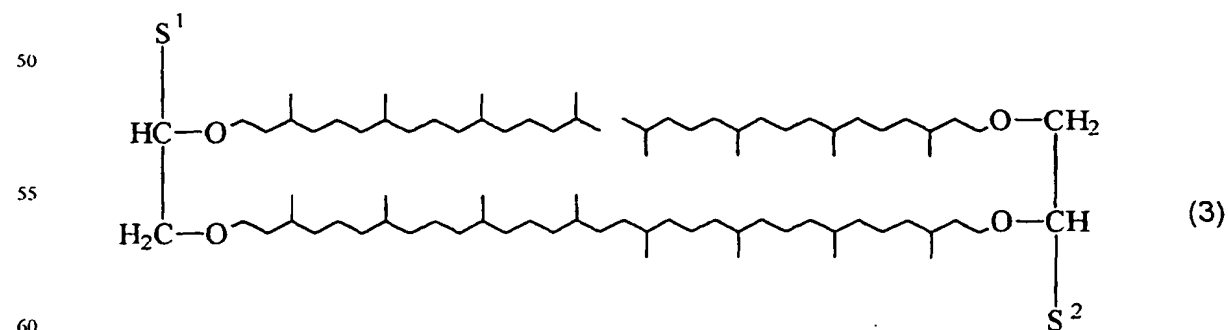
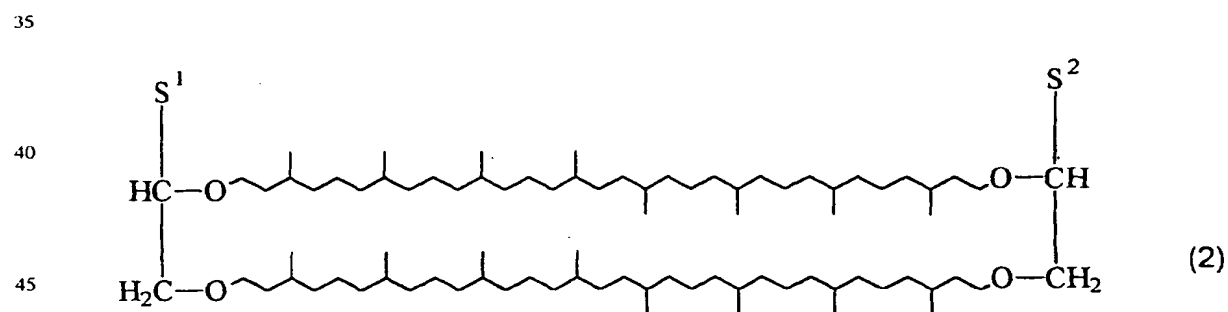
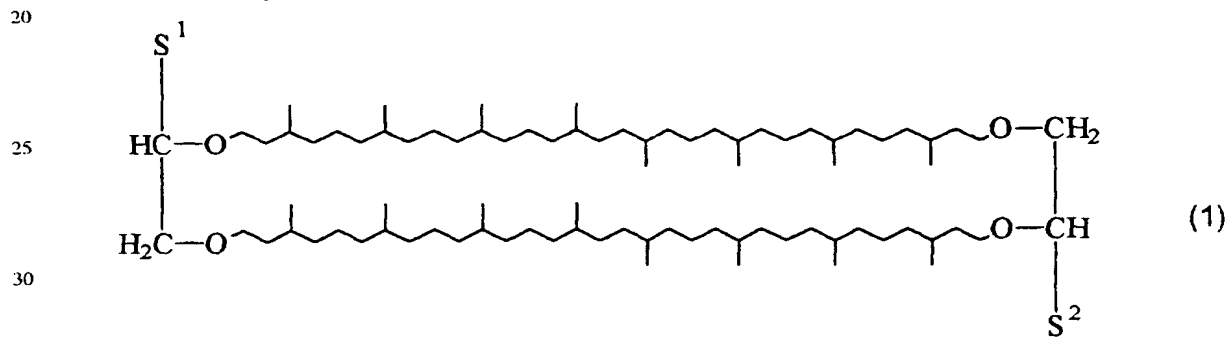
[0128] Das Massenspektrum (FD) der Boc-geschützten Verbindung XII ist in Abb. 15 gezeigt.

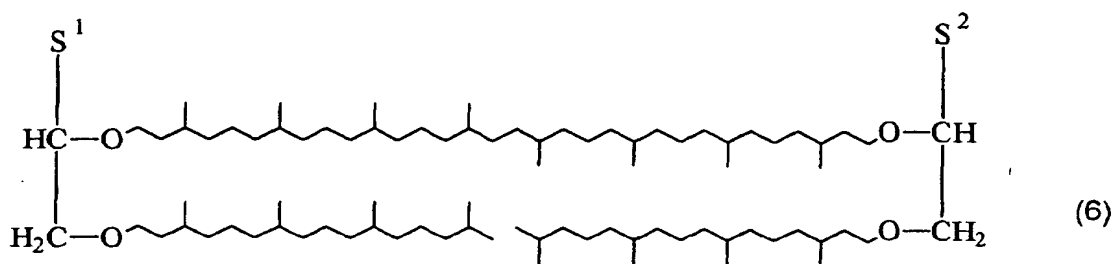
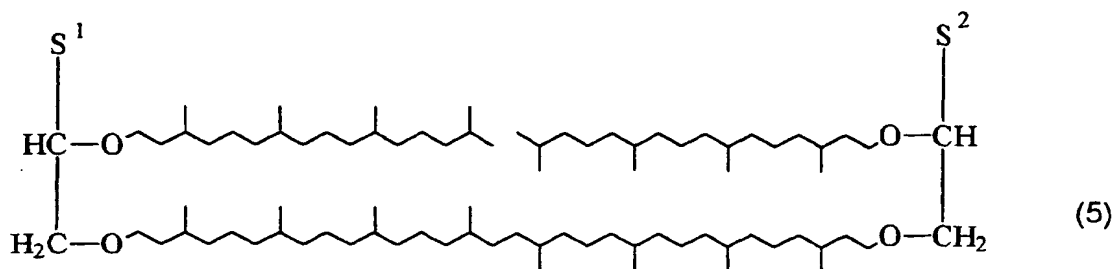
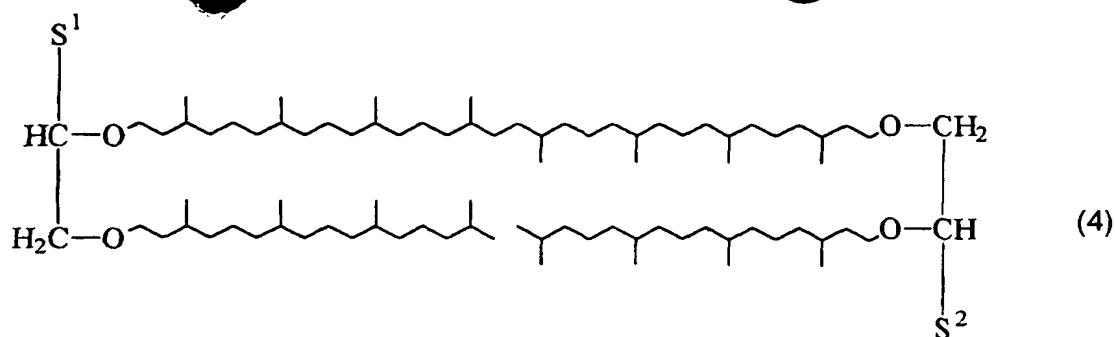


15 [0129] 1.9 mg (0.83 μmol) BOC-AF7 werden mit 0.2 ml CHCl_3 und 0.1 ml Trifluoressigsäure (TFA) 15 min gerührt, um die BOC-Schutzgruppen abzuspalten.

Patentansprüche

1. Tetraetherlipidderivat, dargestellt durch eine der folgenden allgemeinen Formeln (1) bis (6):





wobei S^1 und S^2 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus den Gruppen

$-\text{CH}_2-\text{O}(\text{PO}_2)_n\text{OH}$

und

$\text{A}-\text{X}^1-\text{B}-(\text{X}^2)_q-\text{Y}$

worin bedeuten:

A $-\text{CONR}^1-$, $-\text{COO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{OCO}-$, $-\text{CH}_2\text{NR}^1\text{CO}-$,

$-\text{CH}_2\text{OCONR}^1-$, $-\text{CH}_2\text{NR}^1\text{COO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{PO}_2)_n\text{O}-$ oder $-\text{CH}_2\text{S}-$,

X^1 und X^2 unabhängig voneinander eine verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkyl-, oder Alkenylengruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, die Gruppe $-\text{COCR}^1\text{Y}(\text{CH}_2)_n$ oder die Gruppe $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHCO}-$,

B $-(\text{O}(\text{CH}_2)_m)_n-$, $-(\text{NR}^1\text{COCHN}(\text{R}^1)_2)_o-$ oder $-(\text{NR}^6)_p-$,

Y $-\text{H}$, $-\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{N}^+\text{R}^2\text{R}^3\text{R}^4$, $-\text{OR}^5$, $-\text{COR}^7$ oder $-\text{SR}^8$,

R^1 und R^6 $-\text{H}$, eine verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkyl-, Aralkyl- oder Arylgruppe mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei diese Gruppen mit mindestens einer Gruppe Y substituiert sein können,

R^2 bis R^5 ,

R^7 und R^8 unabhängig voneinander R^1 oder $-(\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2)\text{NH}_2$,

m 1 bis 5,

n 0 bis 150,

o 0 bis 10,

p 0 oder 1 und

q 0 bis 5,

wobei jeweils einer der Reste R^2 bis R^5 , R^7 und R^8 weiter einen Liganden umfassen kann, der über einen Spacer an das Lipid gebunden sein kann,

sowie durch Bildung von Pentazyklen im Tetraethergrundgerüst gebildete Modifikationen davon,

mit der Maßgabe, dass, wenn das Tetraetherlipidderivat durch die allgemeine Formel (I) dargestellt ist, folgende Verbindungen ausgenommen sind:

A = $-\text{CONH}-$, B = $-(\text{NR}^6)_p-$ mit p = 1 und R^6 = $-\text{H}$ oder eine verzweigte oder unverzweigte unsubstituierte Alkyl-,

Alkyl-, Aralkyl- oder Arylgruppe mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen;

$\Lambda = -\text{CONH}-$, $n = o = p = q = 0$ und $Y = -\text{NR}^2\text{R}^3$ oder $-\text{N}^+\text{R}^2\text{R}^3\text{R}^4$; und

$\Lambda = -\text{CH}_2\text{NICO}-$ oder $-\text{CONH}-$, $n = o = p = q = 0$ und $Y = -\text{H}$.

2. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 1, wobei R^1 -H, $-\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$ oder $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ist.

3. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 1 oder 2, wobei Λ aus den Gruppen $-\text{CONH}-$ und $-\text{CH}_2\text{O}(\text{PO}_2^-)\text{O}-$ ausgewählt ist.

4. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 3, wobei Λ $-\text{CONH}-$ ist und B $-(\text{O}(\text{CH}_2)_2)_n-$ ist.

5. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei X^1 und X^2 unabhängig voneinander eine der Gruppen $-(\text{CH}_2)_2-$, $-(\text{CH}_2)_3-$ oder $-(\text{CH}_2)_4-$ darstellen.

6. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei n 2 oder 3 ist.

7. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei n eine Zahl im Bereich von 3 bis 130 ist.

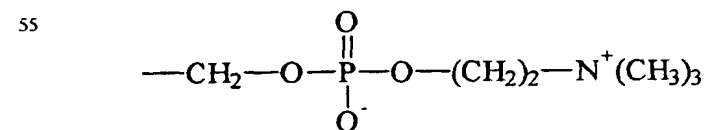
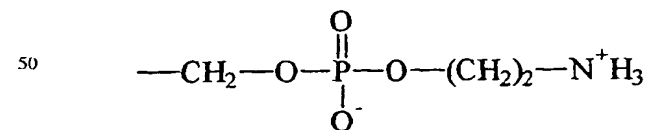
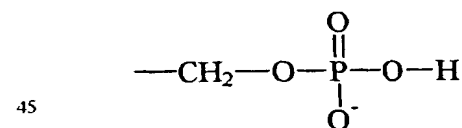
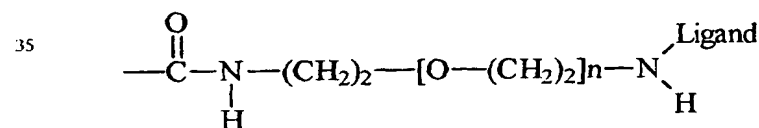
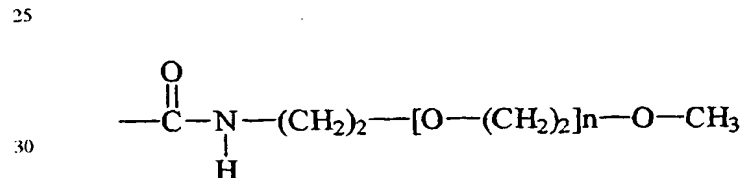
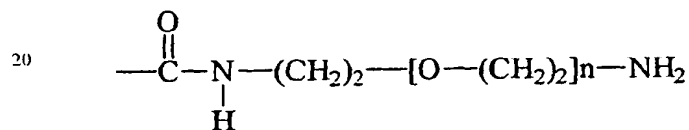
8. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei n eine Zahl im Bereich von 40 bis 85 ist.

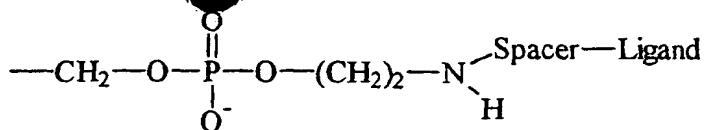
9. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei o eine Zahl von 0 bis 3 ist.

10. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei o 0 oder 1 ist.

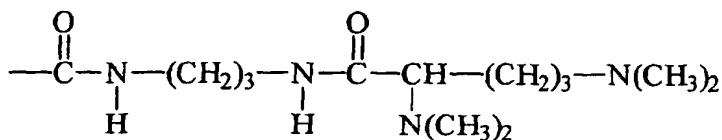
11. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei q 0 oder 1 ist.

12. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 1, wobei S^1 und S^2 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus den folgenden Gruppen:

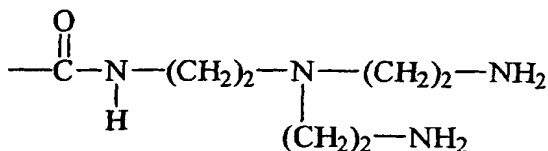




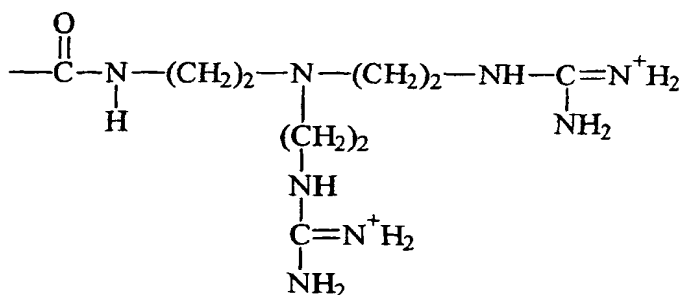
5



10

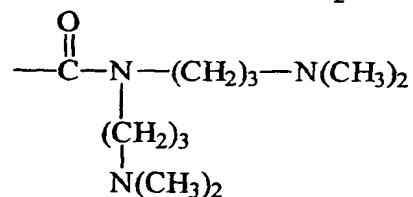


15



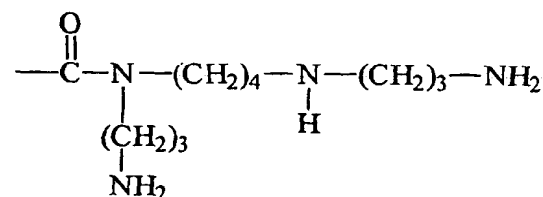
25

30



35

40



45

13. Tetracetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der Spacer eine zweiwertige Verbindungsgruppe ist, dargestellt durch die folgende allgemeine Formel:

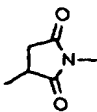
50

-U_r-V-W_s-

worin bedeuten:

55

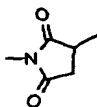
U eine Gruppe, die an das Lipid gekoppelt ist und die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus -O-, -S-, -CO-, -COO-, -CONH-, -CSNH-, -(CN⁺H₂)-, -NH- und



60

W eine Gruppe, die an den Liganden gekoppelt ist und die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus -O-, -S-, -CO-, -OCO-, -NHCO-, -NHCS-, -(CN⁺H₂)-, -NH- und

65



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

V (a) eine verzweigte oder unverzweigte Alkylkette mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen, wobei die Kohlenstoffatome teilweise durch die Gruppen -S-S-, -CO-, -CH(OH)-, -NHCO-, -CONH-, Cyclohexylen, Phenylen, -COO-, -OCO-, -SO₂-, -O- oder -CH(CH₃)- ersetzt sein können, und/oder

(b) eine Polyethylen/propylenglycolkette mit mindestens 3 Ethylen/propylenglycoleinheiten, und/oder

(c) eine Polyethylen/propylenaminkette mit mindestens 3 Ethylen/propylenamineinheiten, und/oder

(d) eine Kohlenhydratkette, und/oder

(e) eine Oligopeptidkette und/oder

(f) eine Polylactidkette,

r 0 oder 1 und

s 0 oder 1.

14. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei der Ligand ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Proteinen, Peptiden, Vitaminen, Kohlenhydraten und Peptidomimetika.

15. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 14, wobei das Protein ein Antikörper, ein Fragment eines Antikörpers, ein Lectin oder ein Apo-Lipoprotein oder ein an einen Zelloberflächenrezeptor bindendes Protein ist.

16. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 14, wobei der Ligand eine Peptidsequenz enthält, ausgewählt aus CDCRGDCFC (über zwei Disulfidbrücken cyclisiert), EILDV, CNGRC (über eine Disulfidbrücke cyclisiert), -c(RGDIK)- (über eine Amidbindung cyclisiert), Peptidsequenzen aus dem Circumsporozoit-Protein und Peptidsequenzen aus Transferrin.

17. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 14, wobei der Ligand ein Vitamin ist, ausgewählt aus Folsäure und Vitamin B₁₂.

18. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei S¹ und S² gleich sind.

19. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei S¹ und S² verschieden sind.

20. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 19, wobei S¹ eine kationische Gruppe und S² einen Liganden umfasst.

21. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 19, wobei S¹ eine neutrale Gruppe und S² einen Liganden umfasst.

22. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 19, wobei S¹ eine anionische Gruppe und S² einen Liganden umfasst.

23. Zusammensetzung, enthaltend zwei oder mehrere der Tetraetherlipidderivate nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

24. Liposom, enthaltend ein oder mehrere Tetraetherlipidderivate nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

25. Liposom nach Anspruch 24, enthaltend weitere Doppelschicht-bildende kationische, neutrale oder anionische Lipide.

26. Liposom nach Anspruch 25, enthaltend das kationische Lipid DOTAP[®] und/oder DOSPER[®] und/oder DC-Chol[®].

27. Liposom nach einem der Ansprüche 24 bis 26, enthaltend die neutralen Lipide Phosphatidylcholin und/oder Phosphatidylethanolamin und/oder Phosphatidylglycerol und/oder Phosphatidylserin und/oder Phosphatidsäure und/oder Cholesterin und/oder Sphingomyelin.

28. Lipidagglomerat, enthaltend ein oder mehrere Schichten einer oder mehrerer Tetraetherlipidderivate nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

29. Lipidagglomerat nach Anspruch 28, enthaltend weitere Doppelschicht-bildende kationische, neutrale oder anionische Lipide.

30. Lipidagglomerat nach Anspruch 29, enthaltend das kationische Lipid DOTAP[®] und/oder DOSPER[®] und/oder DC-Chol[®].

31. Lipidagglomerat nach einem der Ansprüche 28 bis 30, enthaltend die neutralen Lipide Phosphatidylcholin und/oder Phosphatidylethanolamin und/oder Phosphatidylglycerol und/oder Phosphatidylserin und/oder Phosphatidsäure und/oder Cholesterin und/oder Sphingomyelin.

32. Liposom nach einem der Ansprüche 24 bis 27 oder Lipidagglomerat nach einem der Ansprüche 28 bis 31, wobei das Gew.-Verhältnis von Tetraetherlipidderivat zu weiteren Lipiden 5 : 1 bis 1 : 100 beträgt.

33. Liposom nach einem der Ansprüche 24 bis 27 oder 32 oder Lipidagglomerat nach einem der Ansprüche 28 bis 32, enthaltend weiterhin Nukleinsäuremoleküle und/oder Nukleinsäuremolekül-analoge Verbindungen und gegebenenfalls Polykationen.

34. Liposom oder Lipidagglomerat nach Anspruch 33, wobei die Polykationen aus Polyethylenimin, Poly-Lysin und Protamin ausgewählt sind.

35. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend Liposomen nach einem der Ansprüche 24 bis 27 oder 32 bis 34 oder Lipidagglomerate nach einem der Ansprüche 28 bis 34 und ein physiologisch verträgliches Verdünnungsmittel.

36. In vitro-Transfektionskit, enthaltend Liposomen nach einem der Ansprüche 24 bis 27 oder 32 bis 34 und/oder Lipidagglomerate nach einem der Ansprüche 28 bis 34 sowie geeignete Puffer.

37. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 24 bis 27 oder 32 bis 34 oder von Lipidagglomeraten nach einem der Ansprüche 28 bis 34 zum Herstellen eines Medikamentes für die Gentherapie an Säugern.

38. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 24 bis 27 oder 32 bis 34 oder eines Lipidagglomerates nach einem der Ansprüche 28 bis 34 zur Transfektion eukaryontischer Zellen in vitro.

39. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 24 bis 27 oder 32 bis 34 oder eines Lipidagglomerates nach einem der Ansprüche 28 bis 34 zum Verpacken von Wirkstoffen für die orale, enterale, parenterale, intrave-

nöse, intramuskuläre, interartikuläre, topische, subkutane, pulmonale oder intraperitoneale Applikation.

40. Verwendung der Tetraetherlipide nach einem der Ansprüche 1 bis 22 oder der Zusammensetzung nach Anspruch 23 zum Beschichten von Oberflächen, insbesondere von Metall- oder Kunststoffoberflächen.

Hierzu 15 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Abb. 1

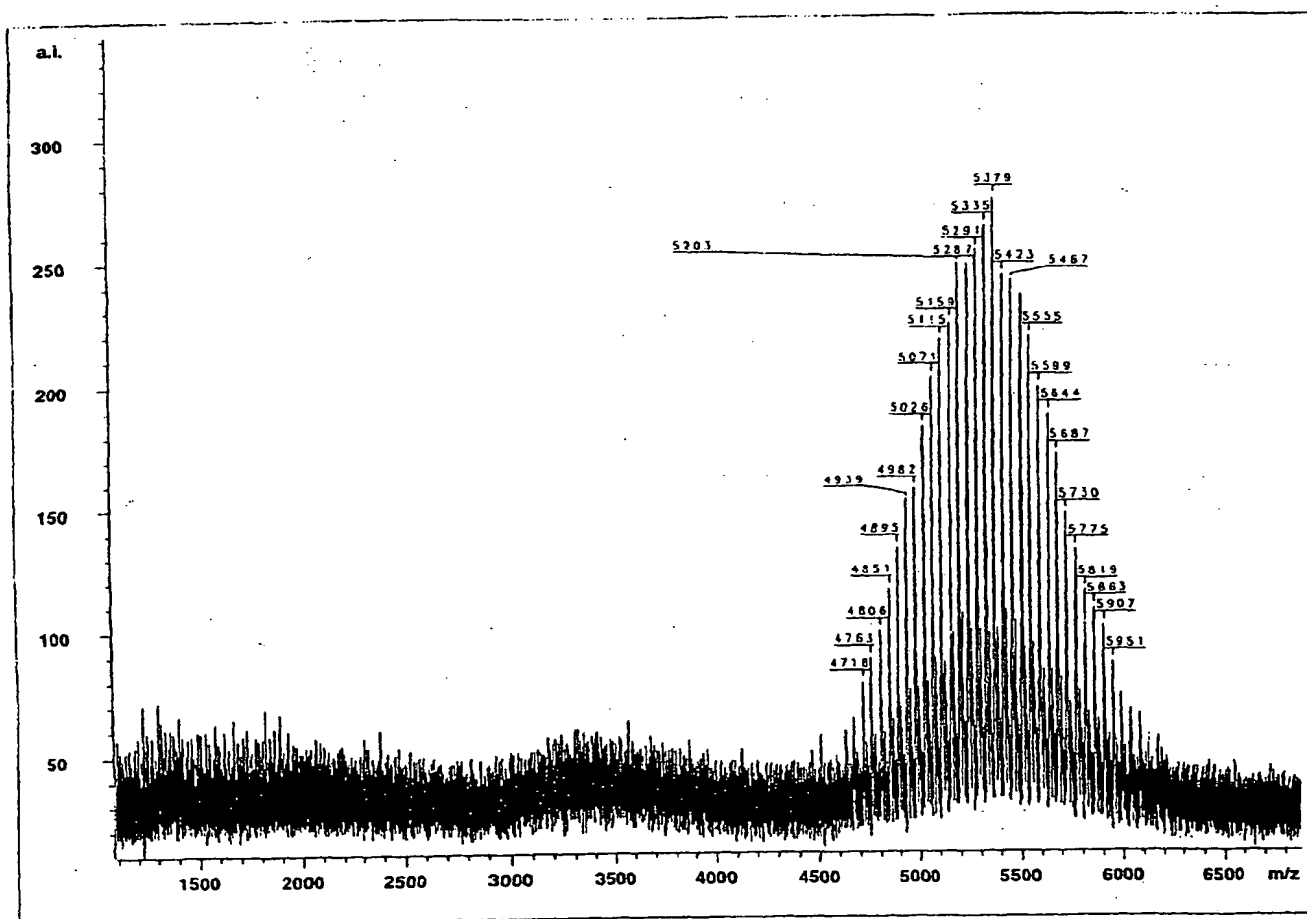


Abb. 2

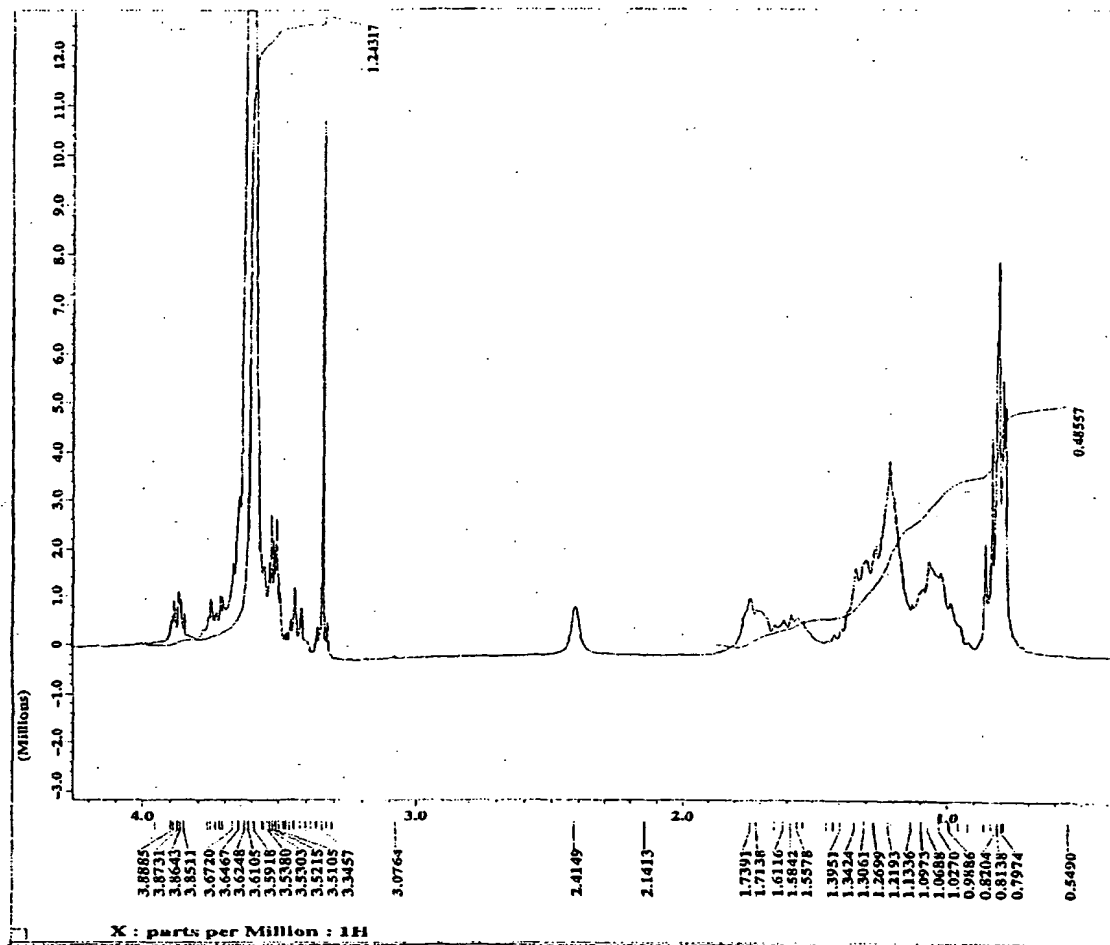


Abb. 3

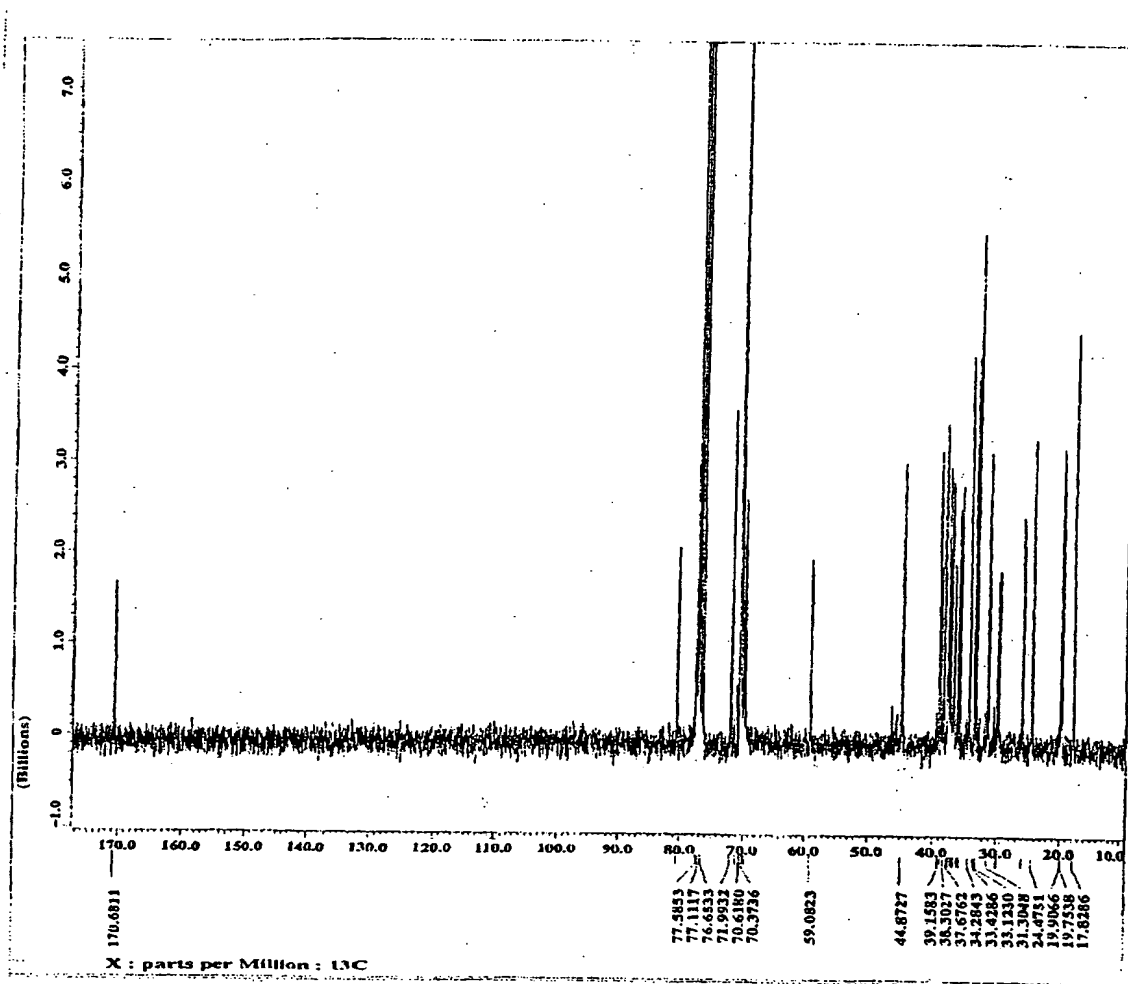


Abb. 4

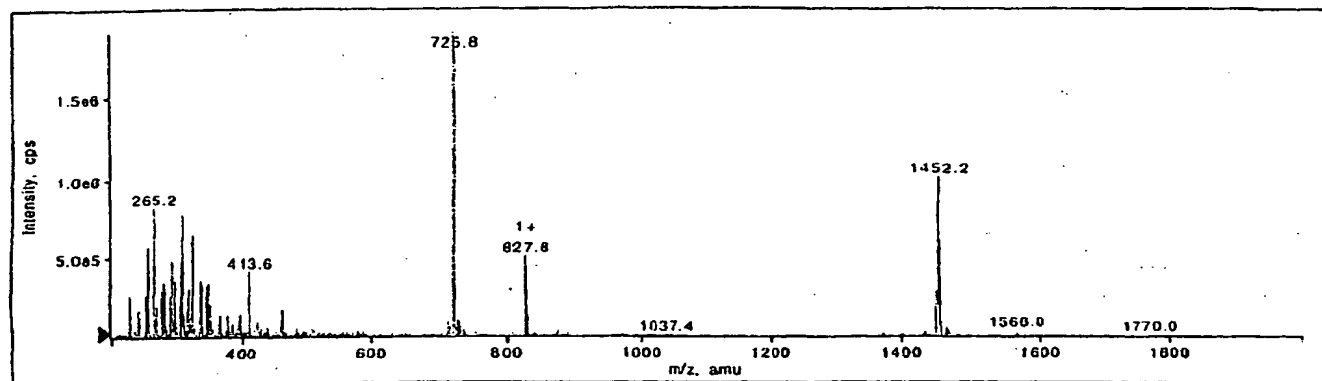


Abb. 5

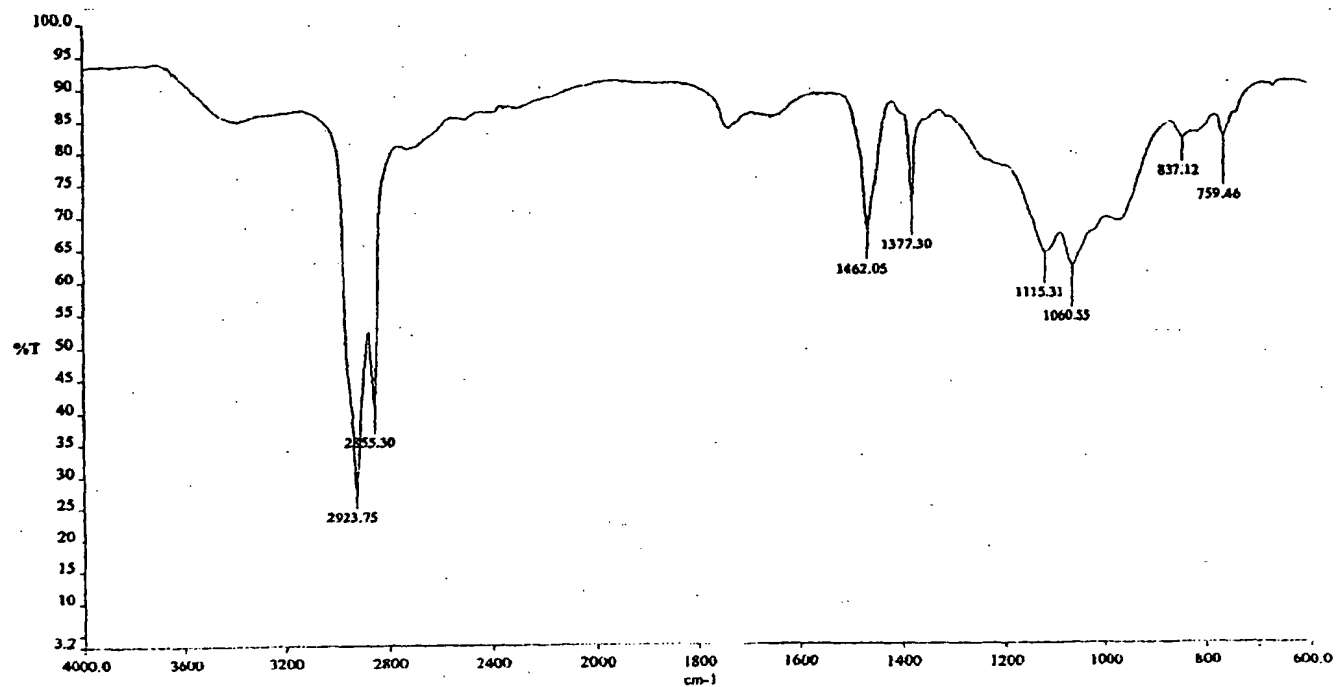


Abb. 6

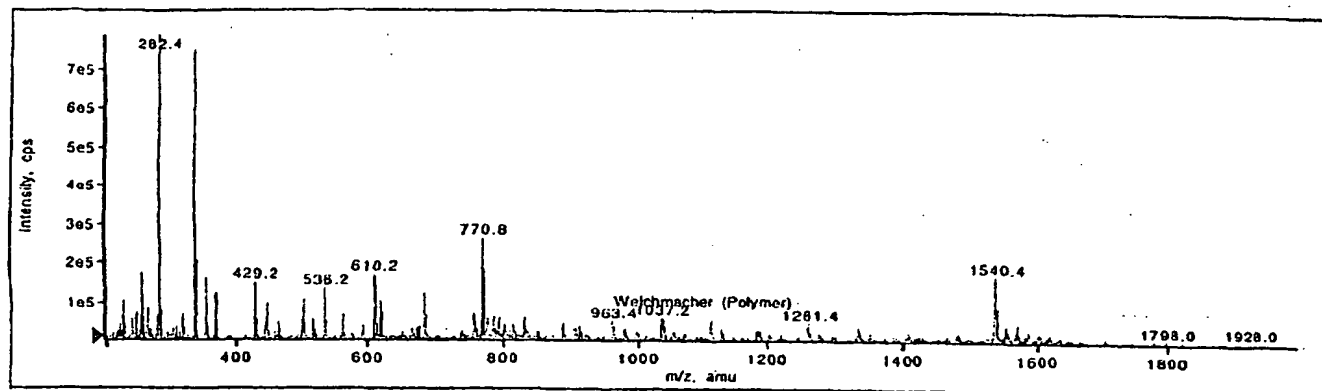


Abb. 7

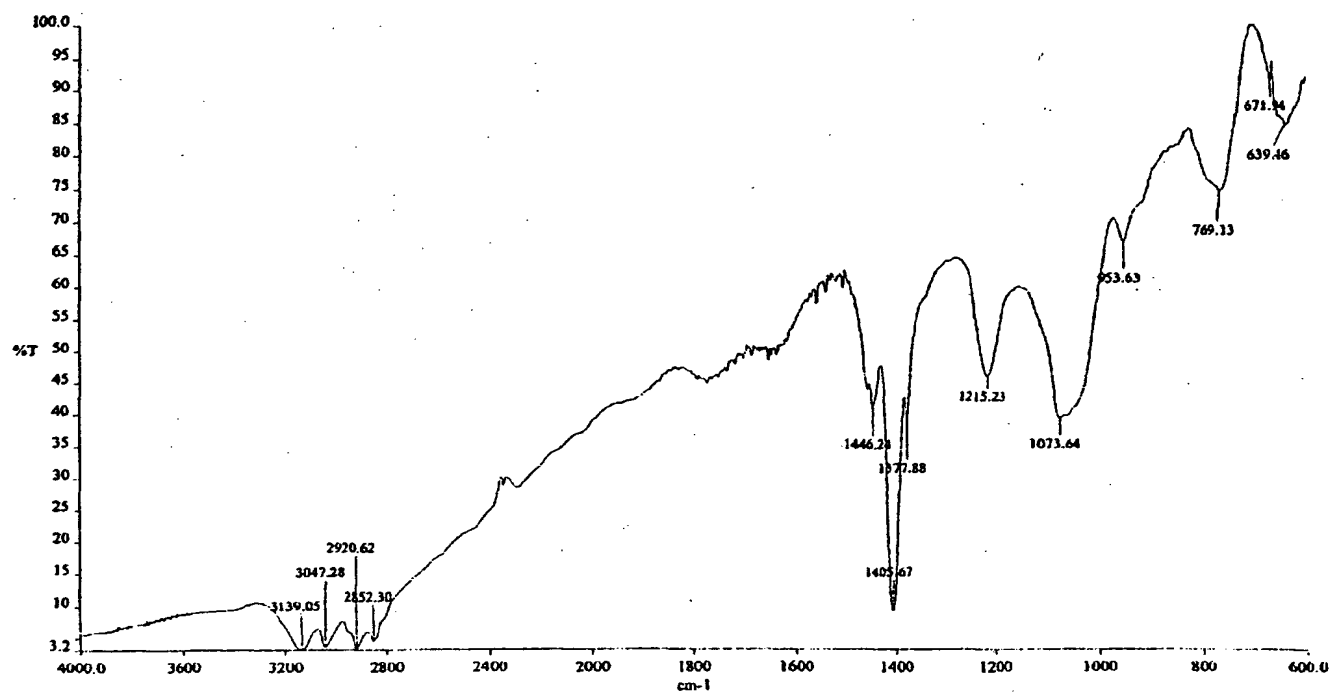


Abb. 8

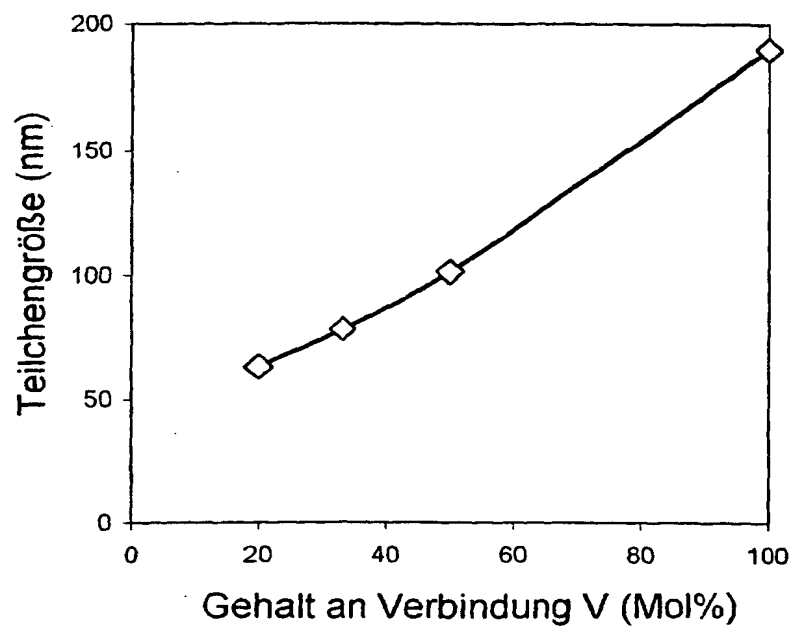


Abb. 9

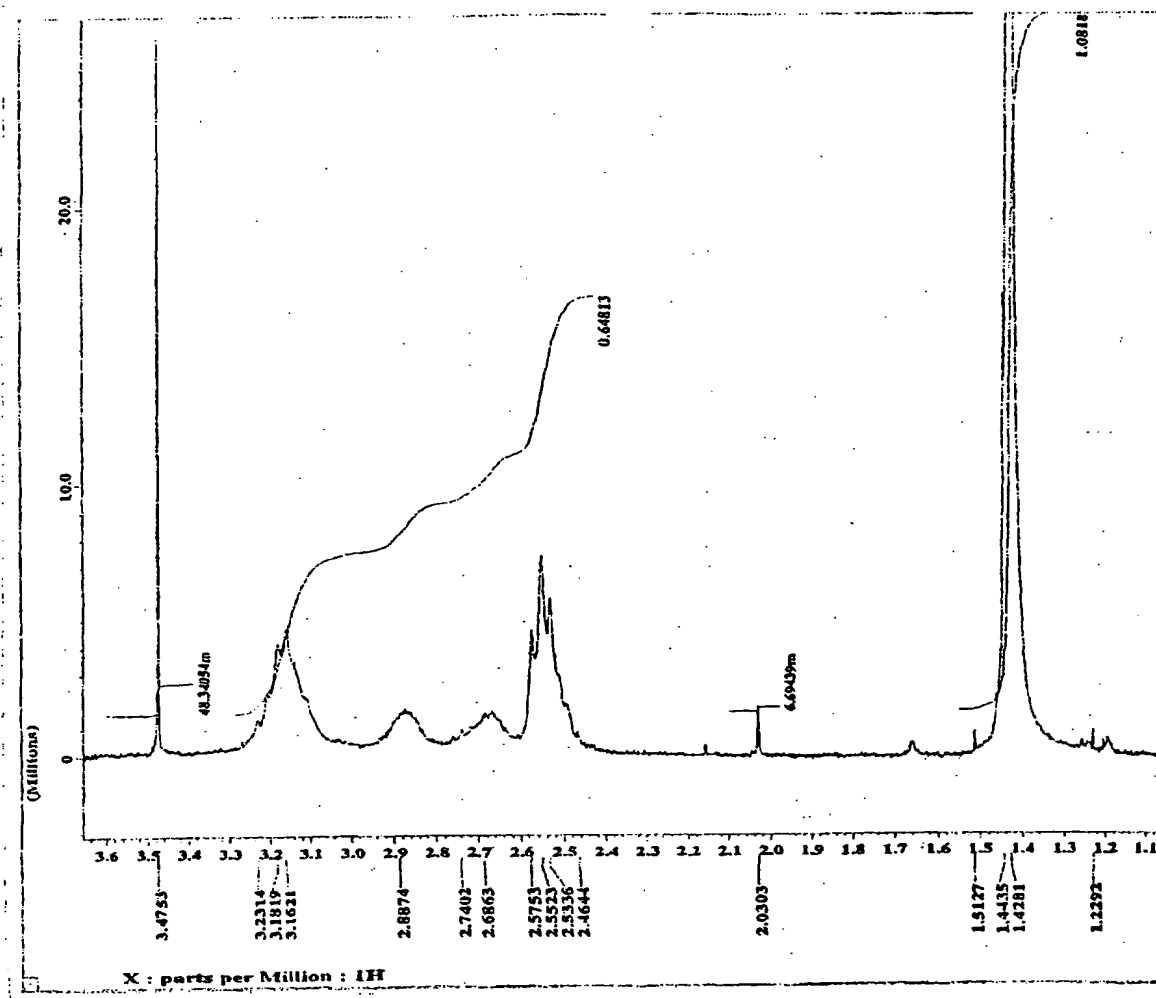


Abb. 10

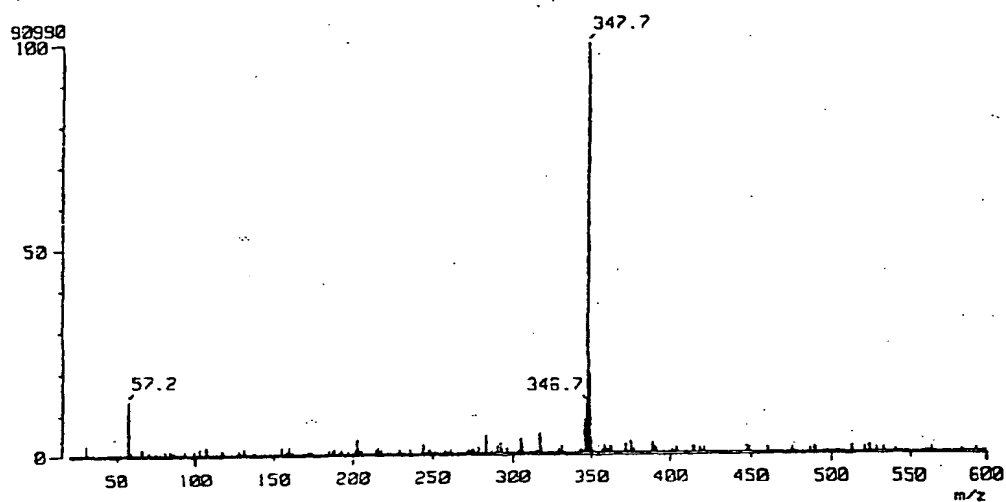


Abb. 11

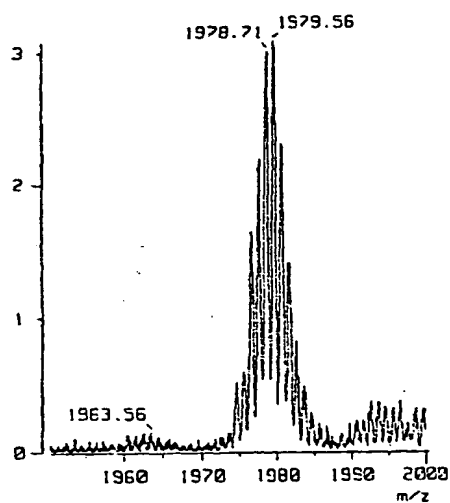
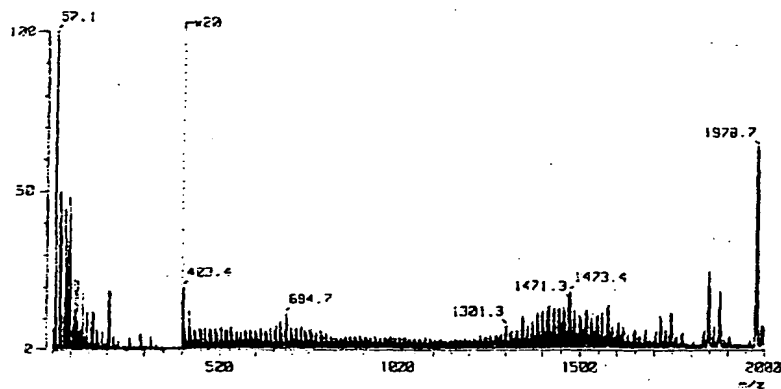


Abb. 12

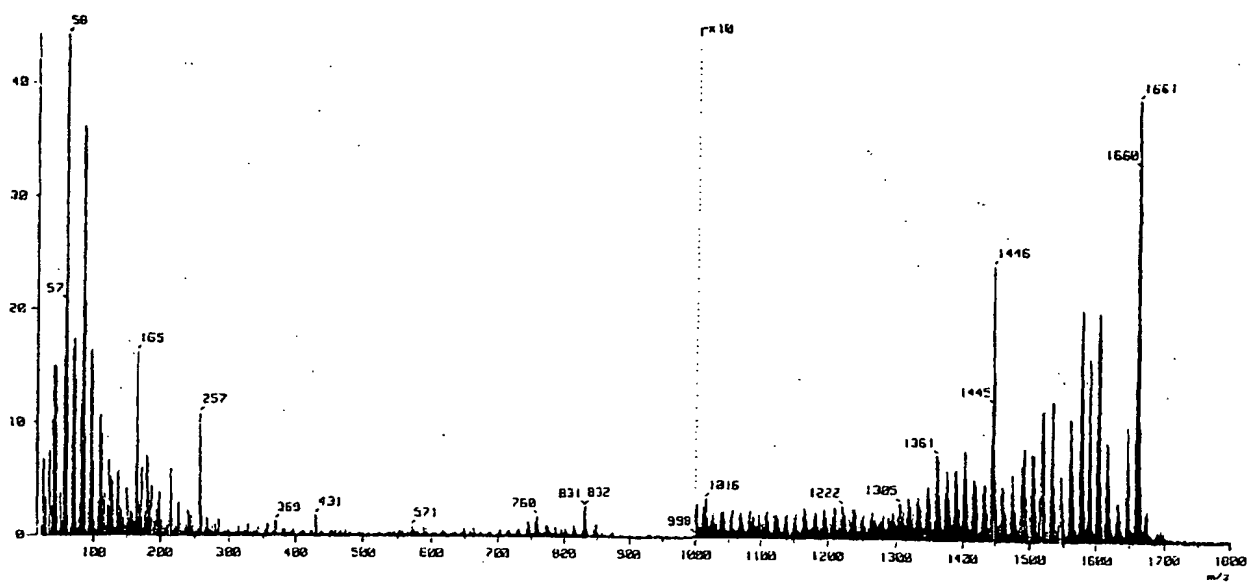


Abb. 13

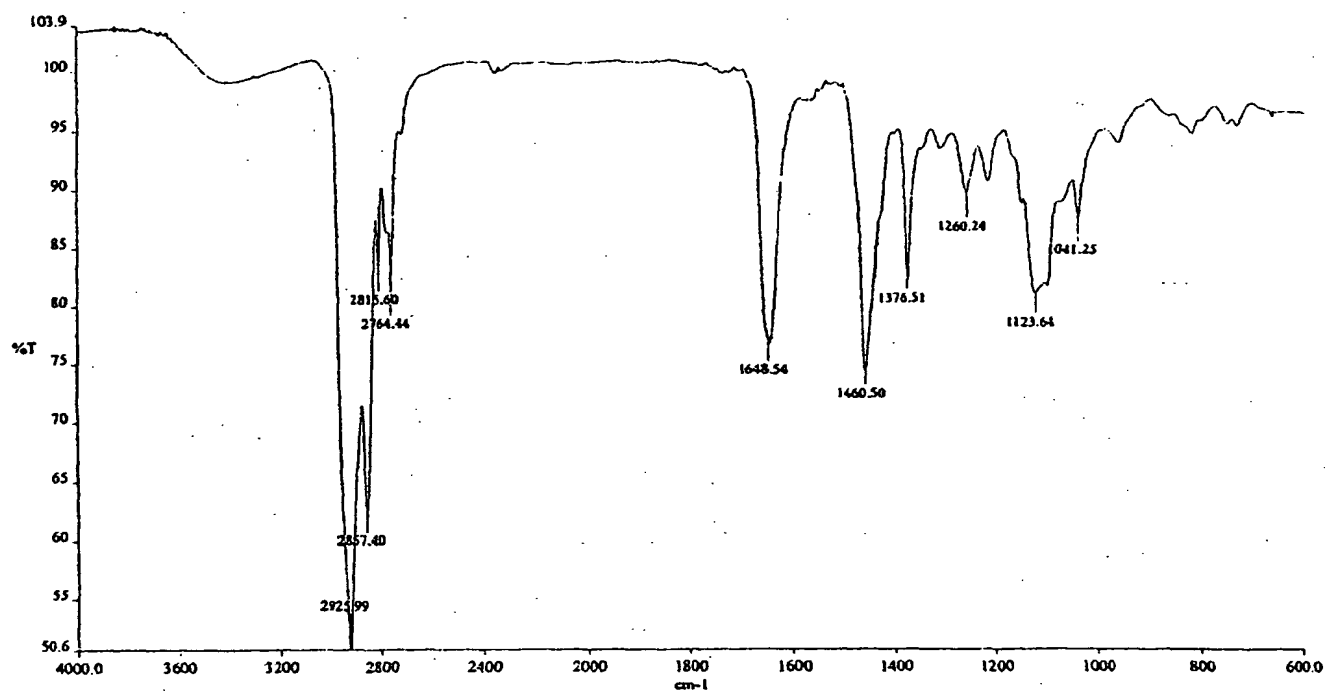


Abb. 14

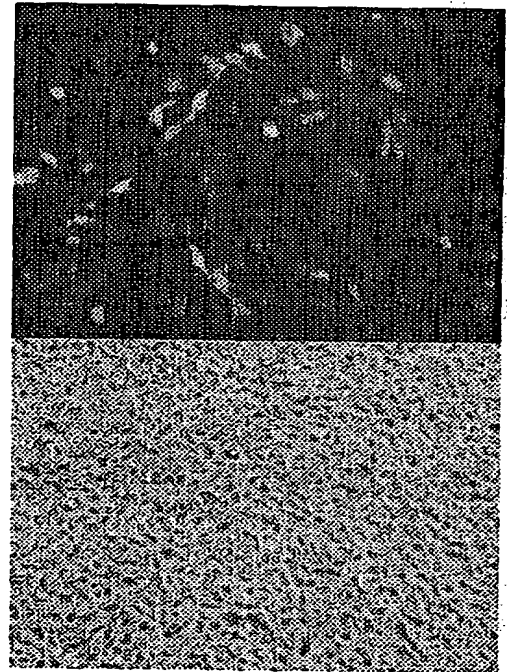
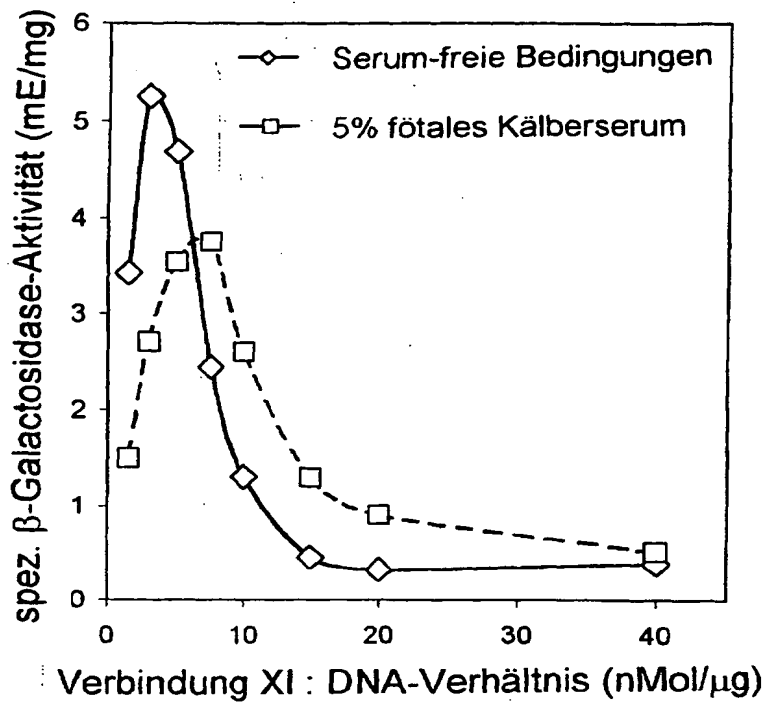
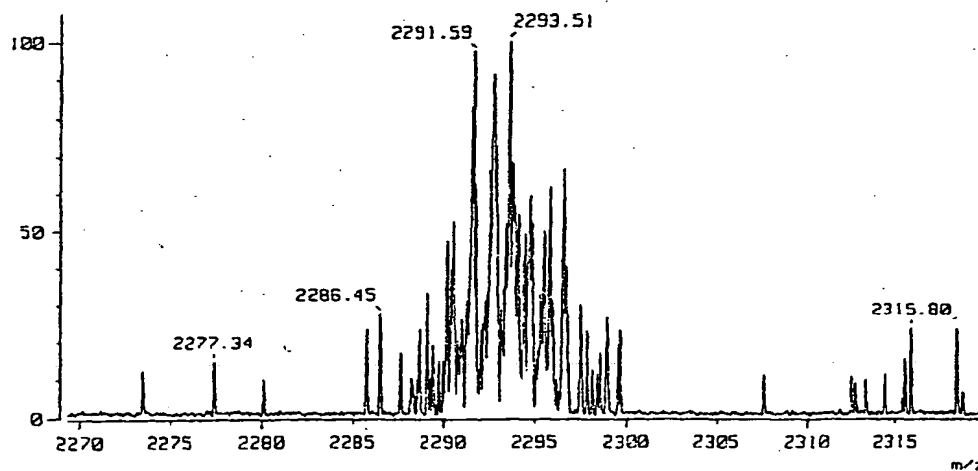
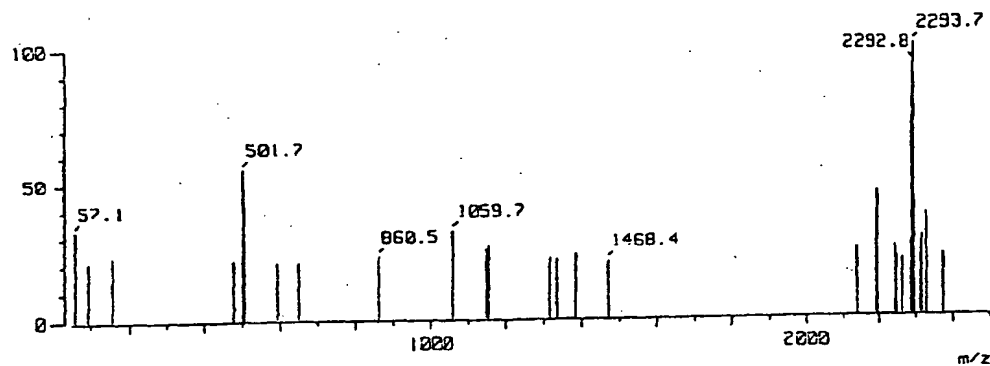


Abb. 15



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.